



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
UNIDAD DE POSGRADOS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS**

Proyecto de investigación y desarrollo  
previo a la obtención del Grado  
de Magíster en Ciencias y  
Tecnologías Cosméticas

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA  
Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
MUESTRAS DE PROPÓLEOS DE  
DIFERENTE LOCALIZACIÓN  
GEOGRÁFICA**

**Autoras:**

**Anita Lucia Guaraca Merchán  
Diana Lucia Palomino Calderón**

**Dirigida por:**

**Mercedes Campo., Ph.D**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA  
Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
MUESTRAS DE PROPÓLEOS DE  
DIFERENTE LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA**



**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y  
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MUESTRAS  
DE PROPÓLEOS DE DIFERENTE LOCALIZACIÓN  
GEOGRÁFICA**

*Autoras:*

**ANITA LUCIA GUARACA MERCHÁN**

Bioquímica Farmacéutica  
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas  
Universidad Politécnica Salesiana

**DIANA LUCIA PALOMINO CALDERÓN**

Química Farmaceuta  
Tecnólogo Laboratorista Clínico  
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas  
Universidad Politécnica Salesiana

*Dirigido por:*

**MERCEDES CAMPO FERNÁNDEZ., Ph.D**

Doctora en Ciencias Farmacéuticas  
Licenciada en Ciencias Farmacéuticas



**PALOMINO CALDERÓN DIANA LUCÍA.  
GUARACA MERCHÁN ANITA LUCÍA.**

***Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica***

Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca - Ecuador, 2018  
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS  
Formato 170 x 240 mm                      Páginas: 103

*Breve reseña de los autores e información de contacto:*



***Diana Lucia Palomino Calderón***

Química Farmaceuta  
Tecnólogo laboratorista Clínico  
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas  
Universidad Politécnica Salesiana - sede Cuenca.  
dianys30000@hotmail.com



***Anita Lucia Guaraca Merchán***

Bioquímica Farmacéutica  
Maestría en Ciencias y Tecnologías Cosméticas  
Universidad Politécnica Salesiana - sede Cuenca  
any.151287@gmail.com

*Director de Tesis:*



***Mercedes Campo Fernández., Ph.D***

Doctora en Ciencias Farmacéuticas  
Licenciada en Ciencias Farmacéuticas  
mcampo1972@yahoo.com

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

©2018 Universidad Politécnica Salesiana.

CUENCA –ECUADOR - SUDAMÉRICA

PALOMINO CALDERÓN DIANA LUCIA & GUARACA MERCHÁN ANITA LUCIA.

Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica.

IMPRESO EN ECUADOR - PRINTED IN ECUADOR

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Anita Lucía Guaraca Merchán, con documento de identificación N° 0104872973 y Diana Lucia Palomino Calderón, con documento de identificación N° 0103373031, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de ser las autoras del trabajo de grado **Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica**, el mismo que ha sido desarrollado para optar el título de: Máster en “Ciencias y Tecnología Cosmética”, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la *Ley de Propiedad Intelectual*, en nuestra condición de autoras, nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Atentamente,

Anita Lucia Guaraca Merchán

CI: 0104872973

Diana Lucia Palomino Calderón

CI: 0103373031

Cuenca, febrero de 2018



## **DECLARATORIA DE COAUTORÍA TUTOR**

Yo, declaro que, bajo mi dirección y asesoría, fue desarrollado el trabajo de investigación **Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica**, realizado por Anita Lucía Guaraca Merchán y Diana Lucía Palomino Calderón, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

Cuenca, febrero de 2018

Dra. Mercedes Campo Ph.D

C.I. 0959164625



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
INDICE DE ANEXOS .....	XV
ACRÓNIMOS Y SIGLAS .....	XVII
RESUMEN.....	XXIII
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Presentación y planteamiento del problema.....	1
1.2 Antecedentes teóricos referentes al problema planteado .....	1
1.3 Justificación de la investigación efectuada .....	2
1.4 Objetivos.....	3
1.4.1. Objetivo general.....	3
1.4.2. Objetivos específicos.....	3
1.5 Hipótesis .....	4
CAPÍTULO II.....	5
2. MARCO DE REFERENCIA .....	5
2.1 Estado del arte.....	5
2.2 Enfoque teórico.....	9
2.1.1. Generalidades sobre el propóleos .....	9
2.2.2 Composición química de propóleos.....	10
2.3 Métodos de caracterización química.....	11

2.4	Compuestos químicos identificados.....	12
2.5	Actividad antimicrobiana de propóleos .....	16
2.6	Conservantes en cosméticos.....	21
2.6.1.	Selección de un conservante .....	23
2.6.2.	Tipos de conservantes.....	25
2.6.3.	Conservantes tradicionales o sintéticos .....	26
2.6.4.	Conservantes alternativos y naturales.....	26
2.7	Descripción de las bacterias usadas en el estudio .....	28
CAPÍTULO III .....		31
3.	MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS.....	31
3.1.	Recolección de las muestras de propóleos.....	31
3.2.	Preparación del extracto.....	32
3.2.1	Resultados y discusión del rendimiento de los extractos de propóleos .....	32
3.3.	Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) .....	33
3.4.	Cromatografía gaseosa – espectrometría de masas.....	34
3.5.	Resultados y discusión de CG-EM .....	35
3.6.	Determinación de la CMI de las muestras de estudio frente a diferentes cepas bacterianas mediante la técnica de microplacas.....	58
3.6.1.	Inoculo bacteriano.....	58
3.6.2.	Control positivo .....	58
3.6.3.	Microdilución.....	59
3.6.4.	Resultados y discusión.....	60
CAPÍTULO IV .....		73
4.	CONCLUSIONES.....	73

ANEXOS .....	75
Glosario .....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis cromatográfico por CCD de los extractos de las muestras de propóleos. ....	34
Figura 2. Cromatogramas gaseosos obtenidos para la muestras PE-11(A), PE-12(B), PE-13(C). ....	37
Figura 3. Estructura y nomenclatura de tres núcleos de diterpenos reportados en propóleos .....	46
Figura 4. Mecanismo de fragmentación propuesto por (Chang et al., 1971) para derivados de pimaradienoatos, isopimaradienoatos y sus 8(14)-monoenoatos. ....	47
Figura 5. Gráfica de normalidad, tiempo 0/ 24 h. <i>P. acnes</i> .....	61
Figura 6. Diagrama de cajas; CMI de <i>P. acnes</i> . ....	62
Figura 7. Gráfica de normalidad, tiempo 0/ 24 h. <i>E. coli</i> .....	63
Figura 8. Diagrama de cajas; CMI de <i>E. coli</i> . ....	64
Figura 9. Gráfica de normalidad, tiempo 0/ 24 h. <i>P. aeruginosa</i> .....	65
Figura 10. Diagrama de cajas; CMI de <i>P. aeruginosa</i> .....	66
Figura 11. Gráfica de normalidad, tiempo 0/ 24 h. <i>S. aureus</i> .....	67
Figura 12. Diagrama de cajas; CMI de <i>S. aureus</i> .....	68
Figura 13. Relación entre la CMI y el porcentaje de polioles en las muestras. ....	69
Figura 14. Relación entre la CMI y el porcentaje de ácido, esteres de glicerina y diterpenos en las muestras. ....	70
Figura 15. Relación entre la CMI y el porcentaje de triterpenos en las muestras.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Relación entre la composición química del propóleo y su origen vegetal.</i> .....	15
Tabla 2. <i>Ejemplos de bacterias evaluadas en estudios antimicrobianos de propóleos</i> .....	18
Tabla 3. <i>Especies de hongos y levaduras empleadas en estudios antifúngicos desarrollados con propóleos.</i> .....	20
Tabla 4. <i>Límites de contenido microbiológico de los productos cosméticos.</i> ....	24
Tabla 5. <i>Condiciones para que un producto cosmético sea considerado libre de contaminación microbiológica.</i> .....	25
Tabla 6. <i>Lista de conservantes tradicionales.</i> .....	26
Tabla 7. <i>Datos de las muestras de propóleos.</i> .....	31
Tabla 8. <i>Rendimiento de extractos de propóleos.</i> .....	32
Tabla 9. <i>Compuestos químicos identificados y cuantificados en las muestras de propóleos mediante CG/EM.</i> .....	38
Tabla 10. <i>Estructura de los fenoles simples identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos</i> .....	42
Tabla 11. <i>Estructura de los ácidos grasos identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos.</i> .....	43
Tabla 12. <i>Interpretación del espectro correspondiente a los éteres de glicerilo identificados.</i> .....	44
Tabla 13. <i>Interpretación de los principales fragmentos obtenidos para los triterpenos identificados</i> .....	51
Tabla 14. <i>Interpretación de los principales fragmentos obtenidos para los triterpenos identificados</i> .....	53
Tabla 15. <i>Tratamientos dados en la microplaca</i> .....	59
Tabla 16. <i>Valores de la concentración mínima bactericida obtenidos al evaluar las tres réplicas los extractos etanólicos obtenidos de los diferentes propóleos sobre E. coli, P. ances, P. aeruginosa y S. aureus</i> .....	60
Tabla 17. <i>DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a P. acnes; tiempo 0 y 24 h.</i> ..	62

Tabla 18. <i>DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a E. coli; tiempo 0/ 24 h</i> .....	64
Tabla 19. <i>DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a P. aeruginosa; tiempo 0/ 24 h</i> .....	66
Tabla 20. <i>DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a S. aureus; tiempo 0/ 24 h.</i>	68

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de masas de la glicerina.....	75
Anexo 2. Espectro de masas del ácido málico.....	75
Anexo 3. Espectro de masas del 2, 3, 4-trihidroxi -1-butanol.....	76
Anexo 4. Espectro de masas de la Ácido -2, 3, 4-trihidroxi-butírico.....	76
Anexo 5. Espectro de masas del ácido - <i>p</i> -hidroxibenzoico.....	77
Anexo 6. Espectro de masas del $\alpha$ -D-arabinopiranososa.....	77
Anexo 7. Espectro de masas del D-Xilosa.....	78
Anexo 8. Espectro de masas del Xilitol.....	78
Anexo 9. Espectro de masas de la D-Fructosa.....	79
Anexo 10. Espectro de masas de la D-Fructosa (isómero).....	79
Anexo 11. Espectro de masas del Desoximioinositol.....	80
Anexo 12. Espectro de masas de la lactona -2, 3, 5, 6-tetrahidroxigalactónico....	80
Anexo 13. Espectro de masas de la D-galactosa.....	81
Anexo 14. Espectro de masas del ácido gálico.....	81
Anexo 15. Espectro de masas del ácido glucónico.....	82
Anexo 16. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.....	82
Anexo 17. Espectro de masas del ácido cafeíco.....	83
Anexo 18. Espectro de masas del ácido oleico (ácido 9-octadecenoico).....	83
Anexo 19. Espectro de masas del ácido pimárico.....	84
Anexo 20. Espectro de masas del octadecilglicerol.....	84
Anexo 21. Espectro de masas del ácido tetracosanoico.....	85
Anexo 22. Espectro de masas del triterpeno.....	85
Anexo 23. Espectro de masas del $\beta$ -amirina.....	86



## ACRÓNIMOS Y SIGLAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BHT</b>	Butil hidroxitolueno
<b>CAN</b>	Comunidad Andina de Naciones
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CG-EM</b>	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
<b>CLAR</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>DCA</b>	Diseño completamente al zar
<b>EEP</b>	Extractos etanólicos de propóleo
<b>EEP</b>	Extractos etanólicos de propóleo
<b>ESI/MS</b>	Espectrometría de masas de ionización por electroespray
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>MAGAD</b>	Ministerio de agricultura y ganadería
<b>MSTFA</b>	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
<b>P</b>	Peso
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>UV</b>	Ultravioleta



## **DEDICATORIA**

A Dios por su amor y bondad infinitos, en los momentos más importantes de mi vida.

A mis padres y mi amado esposo por su amor y apoyo incondicional, los cuales se constituyeron en la piedra angular de mi motivación para esforzarme y ser mejor ser humano y profesional.

Anita

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más, por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a DIOS, a mis preciosas hijas y a mi nieto, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

Diana



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis de grado:

A nuestra directora de tesis, la PhD. Mercedes Campo, por su apoyo, orientación y ayuda para la realización de esta tesis.

Al PhD. Pablo Arévalo, por su valioso e imprescindible asesoramiento en el análisis estadístico de nuestra tesis y por su apoyo en cada paso para la realización de la misma.

A la PhD. Inés Malo por la confianza depositada en nosotras al momento de apoyarnos con el tema de tesis y por su dedicación, apoyo, ánimo, orientación y su infinita generosidad.

A la MSc. Mónica Espadero por su ayuda y colaboración en cada uno de los laboratorios.

A nuestros padres por su apoyo, cariño y comprensión durante todo el proceso de elaboración de esta tesis, sin su apoyo y paciencia, no habría sido posible.



## RESUMEN

Los propóleos son una sustancia resinosa y aromática producida por las abejas, principalmente por la especie *Apis mellifera*, a partir de resinas de partes de vegetales.

El objetivo de la investigación fue establecer la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de diferentes extractos de propóleos que fueron colectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay y Loja, determinando su posible aplicación en la industria cosmética como un conservante natural o sustancia activa biológicamente.

La composición química de los propóleos es muy variable dependiendo de su localización geográfica. Con el empleo de la CG-EM, se pudieron identificar los principales compuestos químicos de las muestras estudiadas. Estos fueron: azúcares, polioles, ácidos fenólicos simples, ácidos grasos, estructuras terpénicas (diterpenos y triterpenos) así como otras no identificadas por la base de datos.

La actividad antibacteriana se determinó por el método de microdilución en placas frente a cepas de *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* siendo efectivo PE -11 frente a las cuatro cepas con CMI de 3,75 mg/mL. Respectivamente para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y 1,875 mg/mL. para *P. acnes*. La muestra PE -12 presentó igual efectividad frente a las cuatro bacterias objeto de estudio, mientras que el PE-13 es más efectivo frente a *Escherichia coli*, aunque no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre los tres propóleos. La cuantificación relativa llevada a cabo mediante CG-EM mostró que no existe un metabolito secundario mayoritario en ninguna de las muestras, por lo que la actividad antibacteriana mostrada se asocia a la mezcla de los diversos metabolitos identificados, siendo más efectivas frente a las bacterias Gram positivas ensayadas.

**Palabras claves:** propóleos, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, composición química.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Presentación y planteamiento del problema

Actualmente la población mundial utiliza cosméticos, que están formulados con químicos que son perjudiciales para la piel, y causan problemas de salud en los consumidores. Por otro lado, la tendencia actual en los compradores es buscar nuevos cosméticos que sean elaborados con ingredientes naturales, que no contengan conservantes artificiales, ingredientes derivados del petróleo o fragancias sintéticas (Pereira, Neila de Paula; Dourado, 2017). En Ecuador está creciendo gradualmente la industria cosmética natural por las preferencias de los consumidores, además, la exuberante y endémica vegetación que existe facilita el desarrollo de esta industria.

En Ecuador no se aprovechan al 100 % los recursos naturales como es el caso del propóleo. No solo por el desconocimiento de su potencial biológico (antibacteriano y antimicótico), sino también por la falta de estudios en cuanto a la composición química, que depende de la ubicación geográfica de la colmena de donde se extraen. Estudios de esta naturaleza contribuirían a desarrollar cosméticos de mejor calidad, eficacia y aceptación.

### 1.2 Antecedentes teóricos referentes al problema planteado

La apicultura en Ecuador es una actividad poco desarrollada a pesar de la exuberante biodiversidad que tiene nuestro país, lo que propiciaría la obtención de productos apícolas de características y propiedades exclusivas (Pesántez & Balcázar, n.d.).

Antiguos pobladores hicieron uso de la miel, la cera jalea, y el propóleo con diversos fines, tales como: impermeabilizantes para las armas, en cataplasmas para curación de heridas, etc. (Salatino, Teixeira, Negri, & others, 2005). En la década de los años sesenta, Ecuador inicia la capacitación y explotación artesanal de las abejas a través de una Agencia de Desarrollo en el sector rural. Según datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGAD) y Agrocalidad, Ecuador se ha enfocado en fortalecer la producción de miel, para lo cual se realizan foros con expertos nacionales e internacionales con vistas a lograr que el país sea uno de los mayores productores a nivel de Sudamérica (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2016). El sector privado ha desarrollado preparaciones con mayor valor agregado (cremas, shampoo, pomadas), que contienen como ingredientes activos productos derivados de la colmena como: polen, propóleos, cera, jalea real. El propóleo es un material resinoso y aromático que las abejas elaboran a partir de exudados de diversas plantas, por lo que su composición química y consecuente actividad biológica pueden ser extraordinariamente variables, en dependencia de la vegetación que rodee la colmena (Nina et al., 2016). Basado en el uso que las abejas le dan a dicho producto e independientemente de los diversos efectos farmacológicos que el mismo posee, la acción antimicrobiana es común para propóleos de diversos orígenes geográficos.

Con estos antecedentes, y tomando en consideración que son muy escasos los estudios de este producto apícola ecuatoriano, surge la necesidad de estudiar propóleos de diferentes localizaciones geográficas del país, buscando, sobre todo, su composición química y el potencial antibacteriano que sustenta su uso en el campo de la cosmeceútica.

### **1.3 Justificación de la investigación efectuada**

Actualmente, la creciente utilización de productos como cremas, shampoo, gel a base de extractos naturales o derivados apícolas está dando lugar a la aparición de un nuevo mercado en la industria cosmética.

La comercialización de propóleos en Ecuador es escasa, por lo que resulta evidente que no se aprovechen las potencialidades del mismo. La información sobre este mercado es insuficiente debido a que se encuentra en una etapa de introducción.

Según referencias bibliográficas, existen diversos estudios a escala mundial que tienen como objetivo la determinación de la composición química de los propóleos, la misma que varía de acuerdo con la región geográfica. Si se toma en consideración el alto endemismo de la flora ecuatoriana, resulta lógico pensar que podría contarse con un producto natural con cierta exclusividad química, terapéutica o biológica. El potencial antimicrobiano de estos productos apícolas permitirá evaluar la potencialidad de los propóleos para la elaboración de cosméticos, incluso podrían aprovecharse como conservantes de origen natural dentro de la formulación.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de diferentes muestras de propóleos, para evaluarlos como posibles ingredientes activos de preparaciones cosmeceúticas.

### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Determinar la composición química de los propóleos mediante métodos Cromatográficos.
2. Determinar la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las muestras objeto de estudio frente a diferentes cepas bacterianas.
3. Correlacionar la composición química de las muestras estudiadas con la actividad antibacteriana.

## **1.5 Hipótesis**

El origen geográfico de los propóleos define la composición química de los mismos y, como consecuencia, el aprovechamiento en la elaboración de cosmecéuticos, debido a su actividad antibacteriana.

# CAPÍTULO II

## 2. MARCO DE REFERENCIA

### 2.1 Estado del arte

En la actualidad, la gran mayoría de formulaciones cosméticas que existen en el mercado tienen como ingredientes base productos orgánicos extraídos de diversas fuentes naturales; al mismo tiempo incorporan químicos para evitar su deterioro y prolongar su vida comercial, pero muchas de las veces, llegan a ser perjudiciales para la piel. En los últimos años, la industria cosmetológica ha ido implementando productos obtenidos de la apicultura tradicional, debido a los múltiples beneficios que estas presentan. Todo esto surge desde tiempos milenarios, en donde la apicultura ha sido aprovechada al máximo. Este es uno de los trabajos que están íntimamente ligados a la sostenibilidad cultural (Jean-Prost, 2007).

Miel, polen, propóleo, jalea real, cera o material vivo son productos que se adquieren de la apicultura, una actividad que resurge con fuerza en el país. Ecuador tuvo su apogeo apícola en la década de los noventa del siglo pasado. Hoy en día, según datos del MAGAP, la producción de propóleos alcanza alrededor de doscientos a trescientos kilogramos por colmena al año; por ello, a partir de 2015, el MAGAP reactivó el Programa Nacional de Apicultura (Pronapis) (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2017).

Los propóleos tienen muchas propiedades biológicas y farmacológicas y sus mecanismos de acción han sido ampliamente investigados en los últimos años, utilizando diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (José Mauricio Sforcin & Bankova, 2011). El estudio de las propiedades biológicas de una muestra dada siempre debe asociarse con su composición química y fuente botánica, que representa

una muestra particular de un área geográfica dada, explorando su potencial biológico y el papel de sus componentes (José M Sforcin, 2016).

Según el estudio realizado por (Miguel et al., 2013) establece que dentro de los principales componentes del propóleo, obtenidos de las especies de *Cistus spp.*, *Rosmarinus officinalis*, *Quercus spp.* y *Arbutus unedo*, se encuentran: 2-acetil furano, benzaldehído verbenene 2,6,6-trimetil ciclohexanona, acetofenona, terpineno, n-nonanal hotrieno, campholenal, trans-pinocarveol, trans-verbenol, pinocarvone, nerol oxide, p-mentha-1,5-dien- 8-ola borneol, terpinen-4-ol, ácido octanoico, myrtenal, terpineol, cis-7-decenal, n-decanal, trans-carveol, cis-ocimenona, carvona, trans-ocimenona, ácido nonanoico, acetato de bornilo, alcohol perilla tymol, carvacrol, ácido decanoico, aromadendreno, alo-aromadendreno, eremofileno, 1,1,5,6-tetrametil-1,2-dihidronaftaleno, viridifloreño, 1,1,5,6-tetrametil-1,2,3 , 4-tetrahidronaftaleno trans-calameneno, cadineno, calacoreno, spatulenol, 6-p-tolil heptan-2-ona globulol, 1-epi-cubenol, eudesmol, n-tetradecanol, n-heptadecano, benzil benzoato, ambroxida, 6-Acetoxi- 11-nor-drim-7-en-9-ona, n-octadecano, n-nonadecano, cembreno, ácido palmítico, 15-nor-labdan-8-ol.

Gracias a esta composición química, presente en la mayoría de propóleos, al ser incorporados a los cosméticos en pequeñas concentraciones durante el proceso de elaboración, cumplen la función de conservantes, y otorgan actividades antimicrobianas y antifúngicas a los propóleos. Por ello, se ha desarrollado y comercializado un número significativo de productos que contienen propóleos; como por ejemplo, suplementos dietéticos, productos para la protección de la salud y prevención de enfermedades, productos biofarmacéuticos y como componente de bio-cosméticos (Vassya Bankova, Popova, & Trusheva, 2016).

La ciencia moderna ha confirmado la acción antimicrobiana y antiviral del propóleo y ha descubierto numerosos beneficiosos farmacológicos, y le ha otorgado

propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antiobesidad, antitumoral y muchas otros (de Groot, 2013), (Kubiliene et al., 2015), demostró la existencia de actividad antimicrobiana no solo contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (15,8 mm), la bacteria formadora de esporas *Bacillus cereus* (17,2 mm) y el hongo *Candida albicans* (16,9 mm), sino también contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* alcanzando diámetros de inhibición de 16 – 20,5 mm.

En relación con el campo de la medicina, se ha sugerido que la actividad contra el cáncer del extracto etanólico del propóleo chino, caracterizado por la presencia de compuestos polifenólicos y flavonoides, ejerce efectos antitumorales, principalmente, a través de la inducción de apoptosis de células de cáncer de mama, debido a su selectividad sobre las células tumorales (Xuan et al., 2014). Un estudio similar lo desarrolló (Seydi, Hosseini, Salimi, & Pourahmad, 2016) en donde evaluó la citotoxicidad selectiva de extractos etanólicos de propóleo (EEP) en hepatocitos y mitocondrias obtenido del hígado de ratas inducidas por Carcinoma hepatocelular (HCC), que muestra una toxicidad selectiva prometedora en hepatocitos de rata HCC a través de orientación mitocondrial e inducción de la apoptosis.

(da Costa et al., 2015) establece que el propóleo rojo mejora la lesión renal aguda por isquemia-reperfusión, gracias a la polisilona que es una sustancia rica en polifenoles que se recolecta de la miel de diversas fuentes que tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

Cabe mencionar que, además, los propóleos juegan un papel muy importante en la industria alimentaria; aquellos que en su composición química presentan, sobre todo, flavonoides y compuestos fenólicos en general, resultan ser una fuente natural de antioxidantes, y brindan estabilidad al alimento; esto se debe a la actividad antirradical y al efecto inhibitor sobre iones metálicos que estos poseen. Hasta la presente fecha

surge la interrogante que el uso de antioxidantes sintéticos, pudieran ser promotores de tumores y cáncer (Vargas Sánchez, Torrescano Urrutia, & Sánchez Escalante, 2013).

Ante esta problemática, la industria cosmética no es la excepción; ya que la mayoría de las formulaciones cosméticas pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, debido a que contienen un elevado porcentaje de agua, y deterioran el producto con el paso del tiempo. Por esta razón, la incorporación de conservantes en las formulaciones cosméticas es primordial para evitar la contaminación microbiana durante la fabricación, almacenaje y uso cotidiano del consumidor. En torno a esto (Goik, Ptaszek, & Goik, 2015) manifiesta que la adición de propóleos a la barra de labios, permite una mejor reconstrucción de la estructura del cosmético, después de que el lápiz labial se haya aplicado a la piel; es decir, no causa cambios significativos en la textura y características de estos labiales. Además un conservante natural que retarda la degradación biológica por microorganismos, que deterioran los cosméticos con el paso del tiempo y producen cambios en el aspecto físico, color, olor y textura.

En virtud a todo lo expuesto anteriormente acerca de investigaciones relacionadas con el tema de tesis, se ha podido esquematizar las principales informaciones teóricas, resultados y conclusiones que respaldan la importancia de corroborar, mediante esta investigación, el potencial antibacteriano del propóleo, que podría emplearse como posible ingrediente activo de preparaciones cosmeceúticas.

## 2.2 Enfoque teórico

### 2.1.1. Generalidades sobre el propóleo

El propóleo es conocido desde la Edad de Piedra por el hombre. Las menciones más antiguas provienen de Egipto, donde los sacerdotes egipcios lo usaban en preparaciones para embalsamar los cuerpos. Más tarde, los griegos lo denominaron *propóleos*, *pro*: que significa delante de o en defensa y *polis* ciudad. Los antiguos pobladores lo llegaron a conocer como un bálsamo milagroso, debido a sus propiedades medicinales (Noriega, 2014), (Bellón Leyva & Calzadilla Mesa, 2007).

El propóleo es una sustancia resinosa y aromática producida por las abejas, principalmente por la especie *Apis mellifera*, a partir de exudados y resinas de partes de plantas, brotes, flores, árboles (Marcucci, 1995), (Peña, 2008). Las abejas usan esta resina para el control biológico y dar mantenimiento a la colmena, para sellar las grietas y hendiduras de las paredes y celdillas de las colmenas (Bellón Leyva & Calzadilla Mesa, 2007).

Los propóleos poseen una variable apariencia física. Algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos. Pueden ser de color ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde (Krell, 1996). Las abejas lo usan para sellar sus colmenas, o como una sustancia defensiva (Samara, Ortega, Benítez Campo & Cabezas Fajardo, 2011), (V. S. Bankova, de Castro, & Marcucci, 2000).

El propóleo ha sido usado desde la Antigüedad en la medicina tradicional. Está compuesto, principalmente, por polifenoles, incluyendo flavonoides (Bellón Leyva & Calzadilla Mesa, 2007), isoflavonoides, ácidos fenólicos, ésteres de ácidos cinámicos sustituidos, aldehídos fenólicos y cetonas (Duke et al., 2017). Se han demostrado varias propiedades farmacológicas, tales como: bactericida, antiviral, hepatoprotectora,

antiinflamatoria, inmunomoduladoras, antioxidante y analgésica (Zwolan, Meresta, & others, 2000), (Navarro-Navarro et al., 2012), (Bezerra et al., 2015).

Varias investigaciones sobre propóleos en diferentes áreas geográficas muestran que existe una diferencia química entre los mismos. Es decir la composición química de los propóleos depende en gran medida de las especies vegetales presentes en la zona de las colmenas (Vassya Bankova, Popova, & Trusheva, 2014).

### **2.2.2 Composición química de propóleos**

Uno de los aspectos de mayor interés entre los investigadores de este campo es descifrar la composición química que poseen los propóleos. Lo interesante radica en que, con el término de *propóleos*, se identifica a una diversidad de matrices que difieren químicamente y, como consecuencia, tienen propiedades biológicas diferentes (Vassya Bankova et al., 2014).

Es conocido que las abejas elaboran propóleos para satisfacer sus propias necesidades, para lo cual recorren diferentes formaciones vegetales con disponibilidad de materias primas, por lo que es de esperar que no existan colmenas que produzcan propóleos idénticos, aun cuando estén en zonas geográficas relativamente cercanas. Se sabe que la composición química del propóleo es compleja y variable entre las diferentes localizaciones geográficas. Las diferencias en la composición están determinadas, principalmente, por la flora del entorno, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas, factores climatológicos, influyen también sobre la técnica de obtención (Kasote et al., 2014).

### **2.3 Métodos de caracterización química**

Resulta importante hacer énfasis que la composición química del propóleo está lejos de ser constante, debido a que las fuentes vegetales son diferentes y, como resultado, la química del propóleo se puede alterar de manera apreciable. Lógicamente, al cambiar el perfil químico de una muestra puede variar su actividad biológica, no solo por la intensidad del efecto, sino que podría ser totalmente diferente e incluso generar efectos adversos. De lo anterior deriva lo sensible que resulta en este campo de investigación la debida estandarización de los propóleos y su control de calidad, desde un punto de vista químico (Talero, Hernández, & Figueroa, 2012).

Múltiples son los métodos que han sido empleados para la caracterización química de los extractos de propóleos o de fracciones obtenidas de estos. Dentro de los métodos analíticos más utilizados podría citarse: espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/MS), electroforesis capilar, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía en capa delgada (CCD) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Palomino, 2009).

La CG-EM ha sido extremadamente útil para analizar no solo compuestos volátiles presentes en propóleos sino también para aquellos que no lo son, pero que pudieran ser sometidos a una derivatización, lográndose resultados satisfactorios.

Múltiples son las investigaciones que hacen uso de esta versátil técnica cromatográfica, sobre todo, para identificar y cuantificar con la ayuda de las bases de datos, los principales compuestos químicos presentes en los extractos objeto de estudio (Plaza Juárez, 2017).

Esta técnica es muy ventajosa, no solo porque ayuda a confirmar estructuras antes dilucidadas por las técnicas de RMN, haciendo uso de pequeñas cantidades de muestras, sino también porque el apoyo de bases de datos permite determinar, cualitativa y cuantitativamente, la composición química de un extracto total (Campo, 2007).

## **2.4 Compuestos químicos identificados**

De manera general, los propóleos contienen: resinas, ceras, polen y compuestos orgánicos e inorgánicos (Campo, 2007).

Las muestras de propóleos analizadas de diversas partes del mundo, han sido reportadas con más de trescientos compuestos químicos diferentes, tales como: ésteres de ácidos fenólicos, flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lignanos, benzofenonas preniladas, aldehídos, esteroides y cumarinas (Huang, Zhang, Wang, Li, & Hu, 2014).

Algunos elementos inorgánicos como calcio, magnesio, potasio, sodio, cinc, cobre, manganeso, cromo, níquel, plomo, cobalto, cadmio y plata, se han determinado en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Stafilov & Kulevanova, 1994).

También se han identificado otros minerales como: aluminio, bario, boro, estaño, hierro, molibdeno, selenio, silicio, estroncio, titanio, vanadio y zinc (V. S. Bankova et al., 2000).

Dentro de los flavonoides identificados en propóleos que con mayor frecuencia informa la literatura están: flavonas (acacetina, apigenina), flavonoles (kaempferol, galangina, aromadendrina), flavanonas (pinobaksina, pinocembrina), isoflavonoides (medicarpina, isosativan, genisteína, mucronulatol), neoflavonoides (Shrestha, Narukawa, & Takeda, 2007).

Otros compuestos también referidos en la literatura son: ácido benzóico y derivados, ácidos p-coumáricos prenilados, ácidos grasos, ácidos alifáticos, fenilpropanoides y derivados, entre otros (La Cerda, Libia; Veras, Mariana; Melo, 2014).

Compuestos químicos tales como terpeno (pinano, ledol, clerodano, cicloartenol), estilbenos (resveratrol, pterestilbeno), esteroides (colesterol), azúcares y polioles (glicerol), vitaminas (tocoferoles), coumarinas (esculetina y escopoletina), lignanos (sesamina, (+)-pinoresinol), aminoácidos (isoleucina), benzofenonas poliisopreniladas, también han sido identificados de muestras de propóleos (Al-Hariri, 2011).

Dentro del grupo de los terpenos se han identificado, fundamentalmente, diterpenos y alcoholes triterpénicos (Marcucci, 1995). Fracciones volátiles de varios tipos de propóleos han mostrado la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos. Dichos compuestos no se encuentran en concentraciones elevadas, aunque influyen en el aroma característico de muchos propóleos.

Los múltiples estudios químicos realizados en los propóleos han permitido establecer una relación entre la composición química de dicho producto apícola y su localización geográfica. Lógicamente, estos estudios han contribuido a determinar el origen botánico de las muestras de propóleos, luego de identificar la vegetación que prevalece en la zona de colecta del mismo (Alday et al., 2016).

La tabla 1 muestra los principales compuestos químicos, según su origen geográfico (Vassya Bankova, Popova, et al., 2016).

En los últimos años se ha ampliado el estudio de la composición química y las actividades farmacológicas de los propóleos recolectados en América Central, el Caribe y Sudamérica, se han reportado diferencias y similitudes con otras muestras analizadas de localizaciones geográficas diferentes (Alday et al., 2016).

Con relación a Ecuador, han sido muy pocos los estudios realizados sobre su composición química; recientemente se publicó una investigación de muestras provenientes de Quito, Guayaquil y Cotacachi, de donde se identificaron flavonoides y triterpenoides. La gran diversidad en la vegetación que existen y su alto endemismo motivan a realizar investigaciones en muestras de propóleos nacionales de otras regiones geográficas, considerando que pudieran presentar un singular potencial biológico.

Tabla 1. *Relación entre la composición química del propóleo y su origen vegetal*

Tipo de propóleos	Origen geográfico	Fuente vegetal	Principales sustancias biológicamente activas	Referencias
Propóleos "canaria"	de Islas Canarias	Desconocida	lignanós furofuranoídes	(Christov, Trusheva, Popova, Bankova, & Bertrand, 2006)
Propóleos verdes	Brasil (Sao Paulo, Río de Janeiro, Minas Gerais)	<i>Baccharis</i> spp. fundamentalmente <i>B. dracunculifolia</i> DC.	ácidos p-cumáricos prenilados; ácidos diterpénicos Ejemplos: Artepillin C, bacarina, druparina, aromadendrina, ácidos cafeoilquínicos	(Marcucci, 1995); (Y. K. Park, Alencar, & Aguiar, 2002)
Propóleos oscuros	Sur de Brasil	<i>Populus</i> spp.	flavonas, flavanonas, ácidos cinámicos y sus ésteres.	(Y. K. Park et al., 2002)
Propóleos marrón	Nordeste de Brasil	<i>Hypis divaricata</i>	ácido felúrico, ácidos grasos insaturados, $\beta$ cariofileno y compuestos fenólicos no identificados	(Y. K. Park et al., 2002)
Propóleos "clusia" (pardos)	Venezuela, Cuba	<i>Clusia</i> spp.	benzofenonas polipreniladas Ejemplo: Nemorosona	(Cuesta-Rubio et al., 2017); (M. Popova et al., 2011)
Propóleos rojos	Norestede Brasil, Cuba, México	Se sugiere especies del género <i>Dalbergia</i>	Isoflavonoides Ejemplos: Medicarpina, vestitol, 3-O-metil vestitol	(Y. K. Park et al., 2002); (Casarin et al., 2005); (Campo, 2007); (Li et al., 2009)
Propóleos "pacífico"	del Regiones del pacífico (Okinawa, Taiwán)	Desconocida	flavanonas C-preniladas	(Chen, 2005); (Kumazawa, Hamasaka, & Nakayama, 2004).
Propóleos del Mediterraneo	Sudeste de Grecia e Islas Griegas, Sicilia, Malta, Croacia	<i>Cupressus sempervirens</i>	Ácido diterpénico Ejemplo: cuprísicos, isocuprísicos, imbricatoloicos, totarol, ferruginol	(Milena Petkova Popova, Graikou, Chinou, & Bankova, 2010); (M. Popova et al., 2012)
Propóleos mangífera	de Indonesia, Omán, Brasil, Myanmar, Tailandia	Exudado de frutas de <i>Mangifera indica</i>	Cardanoles, triterpenos del tipo cicloartanos	(M. Popova et al., 2011); (M. Popova et al., 2012); (E. L. Da Silva & Menezes, 2005); (Li et al., 2009).

Elaborado por: (autoras 2017)

## 2.5 Actividad antimicrobiana de propóleos

Diferentes extractos y formulaciones que contienen propóleos mostraron actividad frente a bacterias Gram- positivas y Gram-negativas, protozoos, hongos y virus (Vassya Bankova et al., 2014). Estos resultados fueron obtenidos con muestras de propóleos procedentes de diferentes especies de abejas y orígenes geográficos.

Un gran número de estudios antimicrobianos (*in vitro*) realizados con propóleos de diferentes continentes, revelaron la actividad inhibitoria frente a bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Boisard et al., 2015). La pinocembrina, un flavonoide presente en muestras de propóleos fue identificada como el compuesto responsable de la actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en muestras de propóleos de Nueva Zelanda, Estados Unidos de América, China, Hungría y Holanda. En algunas muestras de propóleos se determinó la actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans*, el agente causante de las caries bucales (Bueno-Silva, Marsola, Ikegaki, Alencar, & Rosalen, 2017).

La acción del propóleo sobre los microorganismos de la cavidad oral fue evaluada por varios investigadores en estudios *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Se demostró la actividad inhibitoria frente a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Candida sp.* Un estudio demostró que los extractos alcohólicos fueron más efectivos que los acuosos frente a cepas de *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis* and *L. casei* (Bezerra et al., 2015), demostraron la actividad frente a *S. aureus* de extractos con diferentes concentraciones de propóleos.

La actividad frente a microorganismos Gram-negativos ha sido evaluada frecuentemente con diferentes cepas de *Escherichia coli*, apreciándose una gran diversidad de resultados. (Kalogeropoulos et al. 2009) evaluaron doce extractos de propóleos de Grecia y Chipre, y solo dos mostraron inhibición del crecimiento de *E.*

*coli*. Por otra parte, (Sforcin et al. 2000) apreciaron resultados similares en cuanto a la actividad frente a *E. coli* de muestras de propóleos brasileños recolectadas en diferentes estaciones del año.

Los flavonoides pinocembrina, galangina y crisina mostraron actividad frente a la bacteria Gram-negativa *Helicobacter pylori*, agente causante de úlceras y gastritis (Diaz, 2001).

Algunos derivados del ácido cinámico procedentes de propóleos brasileños, fueron evaluados frente a 54 cepas que incluyeron bacterias, hongos y levaduras. El ácido-3,5-diprenil-4-hidroxicinámico mostró los mejores valores de concentración mínima inhibitoria (15,6-31,3 µg/mL.) frente a *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* y *Arthoderma benhamiae* (Velasquez, Boris; Montenegro, 2017).

En propóleos europeos, producidos a partir de especies de plantas del género *Populus*, se demostró que la actividad antimicrobiana se debía a la presencia de flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos y sus derivados. En el caso de los propóleos brasileños producidos a partir de especies del género *Baccharis*, los derivados de ácidos *p*-coumaricos prenilados fueron identificados como los responsables de la actividad antimicrobiana. Las benzofenonas preniladas produjeron inhibición del crecimiento de diferentes microorganismos al emplear muestras de propóleos de origen cubano (V. S. Bankova et al., 2000).

Doce muestras de propóleos colectadas en Estados Unidos de América inhibieron el crecimiento de dos parásitos de las abejas, *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*. Las muestras de propóleos inhibieron los microorganismos en un rango de concentraciones de 7 a 120 µg/mL. (Wilson, Brinkman, Spivak, Gardner, & Cohen, 2015). Algunos ejemplos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas empleados en la evaluación antibacteriana de muestras de propóleos se resumen en la tabla 2.

Muestras de propóleos procedentes de Brasil, Bulgaria, Turquía, Libia o Cuba mostraron actividad inhibitoria frente a parásitos de diversos géneros tales como: *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* y *Plasmodium* (Seydi et al., 2016). En el caso particular de los propóleos de origen cubano ,se observó que solo cinco muestras de las dieciocho evaluadas disminuyeron la viabilidad de *T. vaginalis* a concentraciones menores de 10 µg/mL.. Todas las muestras mostraron inhibición de los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, pero también produjeron citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. Los extractos de propóleos mostraron actividad tanto en el modelo intracelular como extracelular (Ayres, Marcucci, & Giorgio, 2007).

**Tabla 2.** Ejemplos de bacterias evaluadas en estudios antimicrobianos de propóleos

Microorganismos	Autores
<b>Bacterias Gram-positivas</b>	
<i>Staphylococcus</i> spp. ( <i>S. aureus</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. mutans</i> , and <i>S. warnerii</i> ), <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Streptococcus</i> spp. ( <i>S. cricetus</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>S. Pneumonia</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. β-haemolyticus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , and <i>S. viridians</i> ), <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus</i> spp.( <i>Enterococcus faecalis</i> ), <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>Rhodococcus equi</i> .	(Campo, 2007); (Bueno-Silva et al., 2017); (Wilson et al., 2015); (Wilson et al., 2015); (Wagh, 2013); (Burdock, 1998); (Monzote et al., 2012); (Veloz et al., 2015); (Vassya Bankova et al., 2014); (de Groot, 2013); (Kalogeropoulos, Konteles, Troullidou, Mourtzinos, & Karathanos, 2009); (José M Sforcin, Orsi, & Bankova, 2005)
<b>Bacterias Gram-negativas</b>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Porphyromonas anaerobius</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>Veillonella párvula</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Salmonella</i> sp.( <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhi</i> , and <i>S. typhimurium</i> ), <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.( <i>C. pseudotuberculosis</i> ), <i>Helicobacter pylori</i> .	(Campo, 2007); (A. V. Oliveira et al., 2017); (Bueno-Silva et al., 2017); (Monzote et al., 2012); (Wagh, 2013); (Burdock, 1998); (Vassya Bankova et al., 2014); (de Groot, 2013); (Kalogeropoulos et al., 2009).

Elaborado por: (autoras 2017).

La actividad antifúngica del propóleo también ha sido evaluada frente a una gran diversidad de hongos y levaduras. (Kujumgiev et al. 1999) determinaron la actividad antifúngica de trece muestras de propóleos procedentes de Bulgaria, Egipto, Brasil y Mongolia frente a *Candida albicans*. Todos los extractos hidroalcohólicos de propóleos (70% v/v) preparados en una relación 1/10 (m/v) mostraron a los de inhibición superiores a 14 mm. Dichas muestras también mostraron actividad inhibitoria frente a *S. aureus* y a la cepa Weybridge (H7N7) del virus de la influenza aviar. (L. de L. de Oliveira, Carvalho, & Melo, 2014), extrajeron una muestra de propóleo brasileño con alcohol al 96 % y el residuo fue ensayado frente a 67 cepas de levaduras que incluyeron las siguientes especies: 8 *C. albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 15 *C. tropicalis*, dos *C. kefir*, dos *C. guilliermondii*, cinco *C. lusitanea*, dos *C. glabrata*, una *C. stellatoidea*, cinco *Trichosporon* sp. Incluyendo (*T. asahii*, *T. ovoides* y *T. cutaneum*), una *Geotrichum candidum* y tres *Saccharomyces cerevisiae*. El rango de concentración mínima inhibitoria mostró valores entre  $0,32-5 \times 10^{-2}$  mg/mL., se apreció inhibición en todas las cepas estudiadas.

En un estudio realizado recientemente, (Waller et al. 2017) desarrollaron un estudio *in vitro* frente a veinte aislamientos de *Sporothrix brasiliensis*, resistentes a itraconazol, obtenidos de perros y gatos. Todos los microorganismos fueron sensibles al extracto de propóleos pardo empleado; siendo las concentraciones mínimas fueron fungicidas entre 0,78 y 3,125 mg/mL.. El ácido cumárico fue el componente principal identificado en dicha muestra.

Un fraccionamiento de dos muestras de propóleos rojos brasileños guiado por un bioensayo antifúngico mostró que los extractos etanólicos fueron activos frente a doce cepas de *Candida* con valores de concentración mínima inhibitoria entre 32 y 1024  $\mu$ g/mL.. La isoflavona formononetina fue detectada en todos los extractos y fracciones evaluadas mediante CLAR, y cuando se ensayó frente a las cepas de *Candida* mostró la inhibición de seis cepas con una concentración mínima inhibitoria de 25  $\mu$ g/mL. (das

Neves, da Silva, de Oliveira Lima, da Cunha, & de Jesus Oliveira, 2016). En la tabla 3 se incluyeron diferentes especies de hongos y levaduras frente a las cuales fueron evaluadas diversas muestras de propóleos.

**Tabla 3.** Especies de hongos y levaduras empleadas en estudios antifúngicos desarrollados con propóleos

Especies de hongos y levaduras	Autores
<i>Candida spp</i> , <i>Ganoderma applanatum</i> (IEV 017), <i>Lenzites elegans</i> (IEV 012), <i>Pycnoporus sanguineus</i> (IEV 006), <i>Schizophyllum commune</i> (IEV 009)], <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>Macrophomina sp.</i> , <i>Penicillium spp</i> , <i>Phomopsis sp.</i> , <i>Thichoderma spp.</i> , <i>Diplodia seriata</i> , <i>Trichosporon sp</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Sporothrix brasiliensis</i>	(Boisard et al., 2015); (Matny, 2015); (das Neves et al., 2016); (Burdock, 1998); (Pippi et al., 2015); (Capoci et al., 2015); (Vassya Bankova et al., 2014); (de Groot, 2013); (Boisard et al., 2015).

Elaborado por: (autoras 2017).

Algunos investigadores evaluaron la actividad del propóleo frente a diferentes virus. El efecto *in vitro* frente a virus tipo ADN y ARN, incluyendo el virus del herpes simple tipo 1 y 2, adenovirus tipo 2, poliovirus tipo 2 y el virus de la estomatitis vesicular, fue evaluado frente a una muestra de propóleos de origen francés a una concentración de 30 µ/mL. El virus de la estomatitis vesicular y el adenovirus tipo 2 fueron menos susceptibles (Muñoz Rodríguez, Linares Villalba, & Narváez Solarte, 2011). La actividad antiviral *in vitro* de flavonas y flavonoles aislados de propóleos fue evaluada con el virus de la influenza tipo 1, demostrándose que los flavonoles eran más activos que las flavonas en el orden galangina, kaemferol y quercetina (Amoros, Simões, Girre, Sauvager, & Cormier, 1992).

El propóleo ha sido usado en la fabricación de cosméticos por sus propiedades antimicrobianas, principalmente. En Corea se comercializaron cremas para la cara,

cremas para los ojos y lociones con concentraciones de propóleos del 1-3 %. El nivel de aceptación de los clientes estuvo entre un 81 y 83 % (J. S. Park & Woo, 1996).

Estudios realizados por diferentes autores con muestras de propóleos procedentes de diversas latitudes confirmaron las potencialidades antimicrobianas de propóleos. No todos los propóleos muestran el mismo potencial frente a un microorganismo y en algunos casos resultan inactivos a las concentraciones ensayadas. El origen geográfico de las muestras de propóleos condiciona su composición química y esta a su vez las potencialidades frente a diferentes microorganismos. Resulta imprescindible evaluar el potencial antimicrobiano de las muestras de propóleos y a su vez correlacionar el mismo con su composición química, para poder reproducir los resultados obtenidos e identificar las muestras de propóleos con mejor actividad antimicrobiana y frente a qué microorganismos son activas. En las tablas 2 y 3 se resumieron algunos resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana de muestras de propóleos frente a diferentes microorganismos. Estos resultados permitieron verificar el amplio espectro de acción que de forma general muestran los propóleos. Sin embargo, es útil señalar que dicha variedad se logra al agrupar diferentes muestras de propóleos. De forma general, los propóleos parecen ser más activos frente a bacterias Gram-positivas.

## **2.6 Conservantes en cosméticos**

En todas las formulaciones de productos cosméticos existen sustancias de origen químico, mineral, vegetal o animal, en mayor o en menor proporción. Todas estas sustancias que pueden formar parte de un producto cosmético están incluidas en listas, que son permanentemente actualizadas por las agencias reguladoras de los productos cosméticos. En la Unión Europea lo realiza European Commission (European Commission, 2018).

Los conservantes son ingredientes naturales o sintéticos que se definen como sustancias químicas con actividad antimicrobiana que se incorporan en los cosméticos en muy pequeña concentración: entre un 0,000 5 y un 1 % de sustancia activa como el Butil hidroxitolueno (BHT), durante el proceso de fabricación.

Los conservantes se incluyen en las formulaciones cosméticas para reducir el riesgo de contaminación microbiana durante la fabricación, almacenaje y para que permanezca adecuado, seguro durante su tiempo de vida útil y en el uso cotidiano por parte del consumidor, ya que las formulaciones cosméticas son una fuente de nutrientes para bacterias, hongos y levaduras (Leranoz, 2002), (Alvarez-Rivera, Llompart, Garcia-Jares, & Lores, 2015), (Lecce et al., 2016).

Cuando un producto cosmético está contaminado por una bacteria u hongo, se produce cambio en su consistencia, color y olor. En el caso de emulsiones puede producir alteraciones reológicas como pérdida de textura.

Sin el uso de los conservantes, los productos cosméticos, al igual que el resto de productos como son los alimentos, bebidas, fármacos, etc., pueden contaminarse con microorganismos, que pueden tener diferentes orígenes: materias primas, medioambiente, equipo de fabricación, envasado y el personal, o por la utilización por parte del consumidor pudiendo deteriorar, dañar el producto, y posiblemente puede llegar a causar irritaciones, infecciones en la salud del consumidor (European Commission, 2018), (Eurofarma, 2016).

En la actualidad, los conservantes son sometidos a una evaluación rigurosa, que incluye evaluaciones de seguridad y pruebas de calidad, para garantizar de que sean seguros para su uso (European Commission, 2018).

### **2.6.1. Selección de un conservante**

Para proteger al producto cosmético de la contaminación microbiana, es importante primero conocer su formulación para poder realizar una correcta selección del conservante.

El conservante ideal debería reunir las siguientes características:

- a. Tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana.
- b. No producir ninguna reacción de sensibilización.
- c. Tener una estructura química conocida.
- d. Soluble en agua.
- e. Permanecer estable en condiciones extremas de pH y temperatura.
- f. Ser compatible con todos los ingredientes de la formulación y envasado.
- g. No alterar las características organolépticas del cosmético.
- h. Ser barato (Leranoz, 2002).

Ningún conservante actualmente cumple todos estos parámetros, por tal motivo, se usa un sistema conservante (mezcla de uno o más conservantes), que proteja al cosmético durante las fases de elaboración y durante su tiempo de vida útil.

La elección del o los conservantes se realizará con base en: las formulaciones anteriores y considerando la naturaleza química de los ingredientes, método de fabricación a usarse, propiedades fisicoquímicas del producto, tipo de envase, condiciones de aplicación y el coste. Para la elección del conservante hay que tener en consideración la eficacia, estabilidad y seguridad (Leranoz, 2002).

Para evitar que salgan al mercado productos cosméticos contaminados microbiológicamente por el proceso de fabricación y envasado, se han establecido parámetros indicados por la Comunidad Andina de Naciones (CAN) de la cual forma

parte Ecuador. Este organismo elaboró la resolución 1482: Regulación para los límites de contenido microbiológico de productos cosméticos según la resolución 1482 de la CAN dispuso modificar el artículo 4 y el Anexo I de la Resolución 797 *Reglamento de la Decisión 516 sobre Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Cosméticos*, a fin de incluir parámetros que especifiquen los límites de contenido microbiológico, de acuerdo con los riesgos de los productos cosméticos. Los límites de contenido microbiológico se especifican en la tabla 4

**Tabla 4.** Límites de contenido microbiológico de los productos cosméticos

ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
Productos para uso en infantes (hasta tres años) Productos para uso en área de ojos. Productos que entran en contacto con las membranas mucosas.	a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g o mL.
	b. Ausencia de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en 1 g o mL.
	c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o mL.
	d. Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o mL.
Demás productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica	a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g o mL.
	b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Resoluciones en 1 g o mL..
	c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en en 1 g o mL.
	d. Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o mL..
Productos a ser utilizados en los órganos genitales externos	a. Ausencia de <i>Candida albicans</i> .

Elaborado por: (CAN 2012).

Se indica, en la misma resolución que los productos cosméticos que cumplan con los parámetros establecidos en la tabla 5, se consideran libres de contaminación microbiológica, debido a que su formulación crea condiciones adversas al crecimiento de los microorganismos.

**Tabla 5.** Condiciones para que un producto cosmético sea considerado libre de contaminación microbiológica

<b>Condición</b>	<b>Límite</b>
pH ácido	$\leq 3 - 0$
pH alcalino	$\geq 10 - 0$
Soluciones hidroalcohólicas	$\geq 20 - 0 \%$
Temperatura de llenado	$\geq 65 - 0 \text{ }^\circ\text{C}$
Actividad del agua ( $a_w$ )	$\leq 0,75$
Productos de base solvente	Sin límite
Productos oxidante	Sin límite
Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas	15 % al 25 %

Elaborado por: (CAN 2012).

Se entiende como productos de base solvente y productos oxidantes aquellos que, en su formulación, crean condiciones adversas al crecimiento de los microorganismos.

### **2.6.2. Tipos de conservantes**

Los ingredientes cosméticos usados para la conservación del producto se listan en el anexo V del *Reglamento europeo* N.º 358/2014 de la comisión de 9 de abril de 2014, el mismo que modificó los anexos II y V del reglamento (CE) no 1223/2009 del Parlamento Europeo y son considerados como conservantes tradicionales o sintéticos.

En la actualidad, con la tendencia hacia una cosmética natural, se está optando por otros ingredientes que no están catalogados como conservantes, los mismos podrían ser utilizados si se realizan estudios de soportes y a estos se les conoce como *conservantes naturales* o *alternativos* (Leranoz, 2002), (Vega Picón, 2015).

### 2.6.3. Conservantes tradiciones o sintéticos

Los conservantes más utilizados actualmente en las formulaciones de productos cosméticos se muestran en la tabla 6. Actualmente, los parabenos son los conservantes más utilizados aunque con cierta restricción, combinados con fenoxietanol y donadores de formaldehído.

Tabla 6. Lista de conservantes tradicionales

FAMILIA	CONSERVANTE
Ácidos	Ácido benzoico y sus sales
	Ácido dehidroacético y sus sales
	Ácido p-hidroxibenzoico sus sales y ésteres (parabenos)
	Ácido sórbico y sus sales
Alcoholes	Alcohol bencílico
	Alcohol 2,4-diclorobencílico
Derivados fenólico	Fenoxietanol
	Triclosán
Derivados de formaldehído	Diazolidinil urea
	Imidazolinil urea
	DMDM hidantoína
Otros	Yodopropinilbutilcarbamato
	Clorometilisotiazolinona+metilisotiazolinona

Elaborado por: (Leranoz, 2002)

### 2.6.4. Conservantes alternativos y naturales

Actualmente, se buscan nuevas moléculas con actividad biocida o moléculas que generen un entorno desfavorable para los microorganismos, debido a que los consumidores buscan productos más naturales, que sean menos tóxicos. El conservante

alternativo debe cumplir la mayoría de las características anteriormente mencionadas para los conservantes tradicionales, pero actualmente ninguno cumple con estos requisitos.

El modo de acción de estos conservantes naturales es la inhibición del crecimiento microbiano, la oxidación y ciertas reacciones enzimáticas. Dentro de este grupo de conservantes, se encuentran aceites esenciales, flavonoides, compuestos fenólicos, metabolitos microbianos los cuales poseen la acción preservante (Singh & Jain, 2011). También existen otros ingredientes que son usados como conservantes alternativos; a continuación, se realiza una breve descripción de los conservantes naturales y alternativos:

**Aceites esenciales:** Por ejemplo, el aceite esencial de comino, canela, rosa, sándalo, eucalipto, lavanda, limón, aceite del árbol del té, etc., poseen un estrecho espectro de actividad, no son efectivos contra las *Pseudomonas*, y se requieren elevadas concentraciones, lo cual involucra que se va a añadir olor y color en las formulaciones y son inestables, insolubles en agua, incompatibles con algunos ingredientes, pueden ser alérgenos e irritativos para algunas personas. Además tienen un elevado coste.

**Ácido úsnico:** Presente en el extracto de líquen (*Usnea barbata*) el mismo presenta actividad frente a bacterias Gram-positivas y hongos, actúa desacoplando la fosforilación oxidativa, puede causar alergias e irritación en algunas personas.

**Perfumes:** Tal es el caso del ácido anímico, alcohol feniletílico, timol, cinamaldehído, eugenol, etc. Estos se usan para dar olor al producto, y también puede ayudar a conservar el producto pero el inconveniente es que son irritantes, alérgicos para ciertas personas y son difíciles de disolver.

Ésteres de glicerilo: Como gliceril laurato, gliceril caprato y gliceril caprilato. Interaccionan con tensioactivos aniónicos, difíciles de incorporar en las formulaciones (insolubles en agua), buena compatibilidad toxicológica. No son efectivos contra hongos, la cantidad a utilizar depende de la formulación. Tienen buena compatibilidad toxicológica y poseen otras propiedades, como ser solubilizantes, humectantes o hidratantes. En este grupo, se puede incluir la etilhexilglicerina, activo como desodorante.

Polialcoholes: Como glicerol, propilenglicol, butilenglicol, pentilenglicol, hexilenglicol y caprililglicol. Su efectividad depende de la longitud de la cadena y de la disposición de los grupos OH; tienen una limitada solubilidad en agua y no son muy efectivos frente a los hongos, pero sí que lo son frente a bacterias.

Hidroxiácidos: Como es el caso del ácido láctico, el cítrico son efectivos debida a la modificación del pH. Presentan el problema que deben añadirse a temperaturas por debajo de 40 °C y almacenarse a temperaturas menores de los 25 °C (Lemmel, 2008).

## **2.7 Descripción de las bacterias usadas en el estudio**

### ***Escherichia coli***

Morfología: Es una bacteria Gram-negativa en forma de bastón, por lo general de 1-3 µm de largo y 0,5 µm de diámetro. Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. Sirve para verificar su apego a buenas prácticas de manufactura (BORIE et al., 1997).

### ***Staphylococcus aureus***

Morfología: Es una bacteria Gram-positiva que está formada por cocos Gram-positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas, que produce enterotoxinas. Es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano, es responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida (Cervantes-García, García-González, & Salazar-Schettino, 2014), (Shahdordizadeh et al., 2017).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Morfología: Es un bacilo Gram-negativo, aeróbica, no formadora de esporas, están dotados de motilidad debido a la presencia de flagelos polares. Algunos producen pigmentos hidrosolubles, se le considera un patógeno oportunista. Es común en ambientes húmedos, puede colonizar a los humanos con las defensas normales y causar enfermedad en los huéspedes humanos con defensas anormales. Además, es la principal causa de infecciones nosocomiales (Ortiz-Herrera, Gerónimo-Gallegos, Cuevas-Schacht, Pérez-Fernández, & Coria-Jiménez, 2004), (Chatterjee et al., 2016).

### ***Propionibacterium acnes***

Morfología: Es un bacilo anaerobio Gram-positivo, reside en los folículos pilosebáceos de la piel colonizando las glándulas sebáceas ricas en lípidos. Es un comensal inofensivo, aunque se ha asociado con la formación del acné vulgar y con el proceso de inflamación en este (J. B. N. F. da Silva et al., 2013), (Feuillolay et al., 2016), (Brüggemann et al., 2004), (Handa & others, 2012), (Bhatia, Maisonneuve, & Persing, 2004).



## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

#### 3.1. Recolección de las muestras de propóleos

Según el estudio realizado por (López, Marti, Subovsky, & Castillo, 2016), se utilizaron tres métodos de recolección de propóleos que son con cuñas, mallas y raspado, se ha concluido que el método usado en la recolección de propóleos no influye en el rendimiento. Las muestras se recolectaron por el método más sencillo y tradicional, que consiste en el raspado de los marcos de madera de la colmena con la ayuda de una espátula metálica.

Las muestras de propóleos objeto de estudio se identificaron como PE-11; PE-12 y PE-13. Los propóleos estudiados fueron producidos por abejas de la especie *Apis mellifera*. Los datos de cada una de las muestras se resumen a continuación (tabla 7).

Tabla 7. Datos de las muestras de propóleos

Identificación	Apicultor	Fecha de recolección	Localización
PE-11	Luis Galarza	25/09/16	Parroquia Santa Ana. Azuay
PE-12	Carlos Lapo	23/06/16	San Pedro de Vilcabamba, Loja
PE-13	Pablo León	mayo/16	San Pedro de Vilcabamba, Loja (zona montañosa)

Elaborado por: (autoras 2017).

### 3.2. Preparación del extracto

Las muestras PE-11 (63,88 g), PE-12 (137,85 g) y PE-13 (56,43 g), se sometieron a un proceso de maceración en un erlenmeyer, utilizando como disolvente metanol puro, (Sigma Aldrich) cantidad suficiente para cubrir completamente las muestras. El proceso se realizó durante siete días con recambio de disolvente al tercer y quinto día. Los extractos metanólicos se filtraron con algodón desengrasado, se reunieron y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador Büchi a 40 °C a presión reducida. Los extractos secos de propóleos se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar, conservándose a temperatura de 6 - 8 °C hasta sus análisis.

#### 3.2.1 Resultados y discusión del rendimiento de los extractos de propóleos

El cálculo del rendimiento para los tres propóleos estudiados, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{P \cdot 100}{m}$$

Donde **P** es el peso de extracto seco (g) y **m** es el peso del propóleos crudo (g).

Los rendimientos obtenidos en el proceso de extracción de las muestras de propóleos se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Rendimiento de extractos de propóleos

MUESTRA	PESO DEL PROPÓLEOS CRUDO (g)	PESO DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO
PE-11	63,88	15,59	24,4183 %
PE-12	137,85	29,22	21 – 20 %
PE-13	56,43	11,44	20 – 28 %

Elaborado por: (autoras 2017).

### **3.3. Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)**

La CCD se desarrolló utilizando placas de Sílica gel GF254 (0,20 mm) con dimensiones de 5 x 10 cm. Estas se encontraban sobre soporte de aluminio. Las muestras se aplicaron con el uso de capilares de vidrio, dejando secar al ambiente las aplicaciones.

Se utilizó una cámara cromatográfica de vidrio de 21,5 cm de altura y de 23 cm x 6 cm el área de la base. La corrida cromatográfica se realizó bajo una cámara extractora de gases en el laboratorio y se trabajó a temperatura ambiente (25-29 °C). El tiempo de saturación de la cámara fue de quince minutos.

La fase móvil utilizada en las corridas cromatográficas fue una mezcla de cloroformo: metanol en proporciones 9:1. Todos los disolventes fueron químicamente puros. Después de la corrida, el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

El revelado físico se desarrolló al someter la placa bajo la luz ultravioleta, a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm.

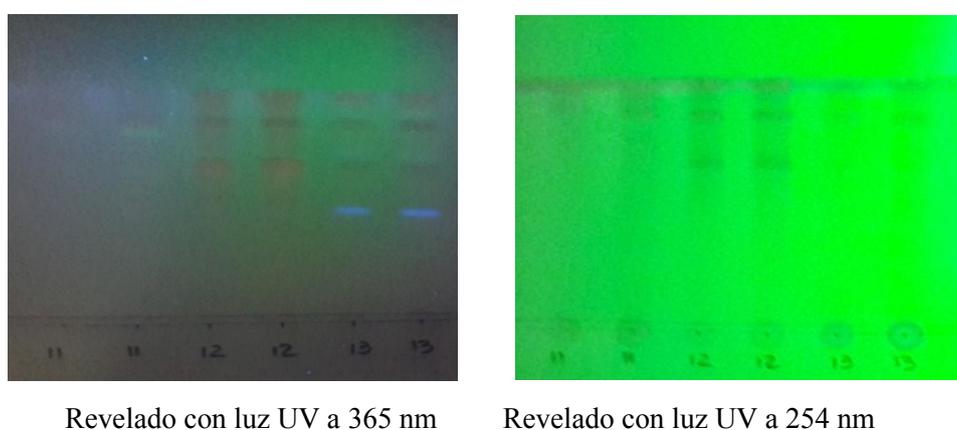
#### **3.3.1. Resultados y discusión del análisis por CCD**

Las tres muestras de propóleos objeto de estudio fueron analizadas por CCD con el objetivo de establecer una comparación química preliminar entre ellas.

Como se puede apreciar en la figura 1, el revelado físico mediante la luz UV en ambos casos muestra fluorescencia en un diverso número de manchas, lo cual sugiere la presencia de compuestos químicos con grupos cromóforos conjugados en sus estructuras, a  $R_f$  entre medios y altos. La muestra PE-12 bajo ambos efectos UV, parece

tener una mayor diversidad de este tipo de metabolitos, capaces de absorber bajo la luz a 254 y 365 nm.

Realizando un análisis comparativo desde el punto de vista cualitativo, a simple vista se puede apreciar que las tres muestras no presentan un perfil químico similar, al menos bajo las condiciones cromatográficas empleadas.



Leyenda: de izquierda a derecha: muestra PE-11, PE-12 y PE-13

**Figura 1.** Análisis cromatográfico por CCD de los extractos de las muestras de propóleos

Elaborado por: (autoras 2017).

Por tal motivo, se decide utilizar la CG-EM para identificar quienes serían los marcadores químicos de cada uno de los extractos de propóleo obtenidos.

### **3.4. Cromatografía gaseosa – espectrometría de masas**

10 mg del extracto de propóleos se disolvieron en 1 mL. de etanol al 90 %. Se tomaron 100  $\mu$ L de la disolución y se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se derivatizó con 50  $\mu$ L de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) a 100 °C por treinta minutos.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent modelo GC 6890 acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar HP 5973N. La inyección de la muestra se realizó por el modo “split” con una relación de 1:10, siendo la temperatura del inyector 280 °C. Se trabajó con una temperatura inicial de 80 °C y el cromatógrafo se programó a 60 °C por 2 min, incrementándose hasta 310 °C con una relación de 3 °C min<sup>-1</sup>, seguido de un proceso isotérmico de 20 min. El volumen final de inyección fue de 1 µL. Los componentes de la muestra se fraccionaron en la columna HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm). El tiempo total de corrida fue de 100 min, operando por ionización electrónica a 70 eV con un rango de masas de 35 - 700 uma. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 0,8 mL/min.

Las estructuras identificadas fueron propuestas a partir de la comparación con la base de datos del equipo (NIST 98) y sobre la base del proceso de fragmentación general.

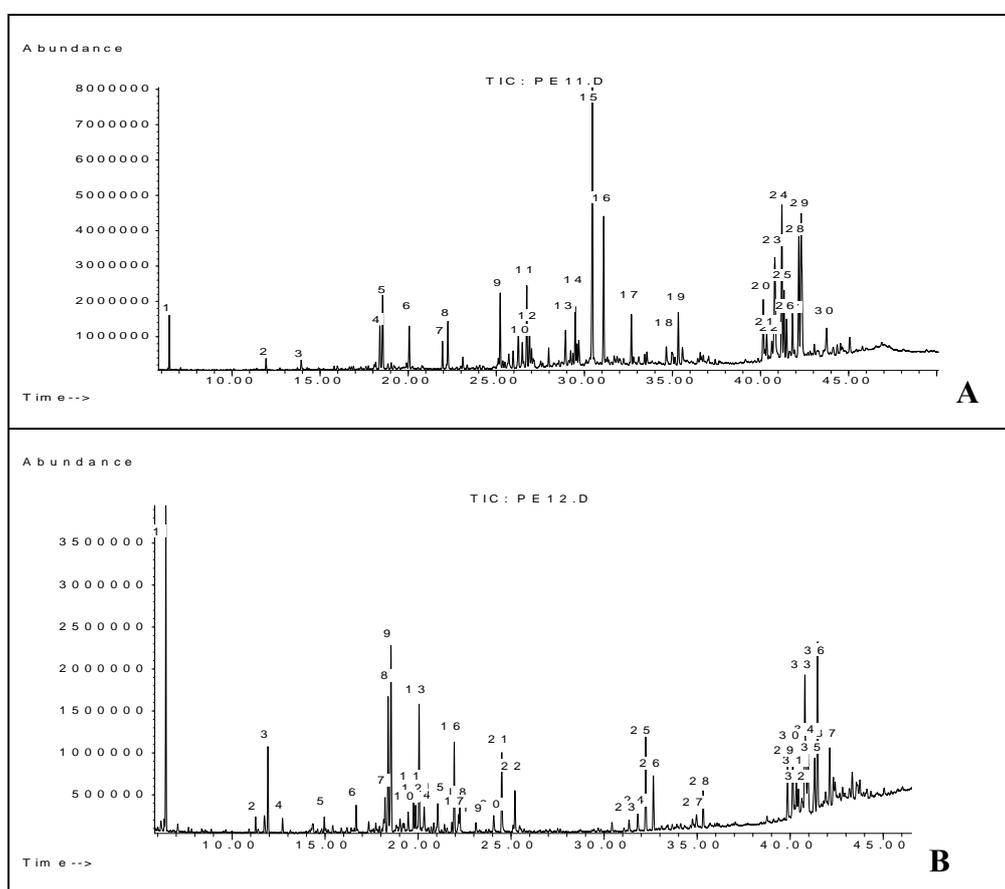
La cuantificación relativa de los compuestos se realizó por normalización interna del área bajo la curva de cada pico cromatográfico.

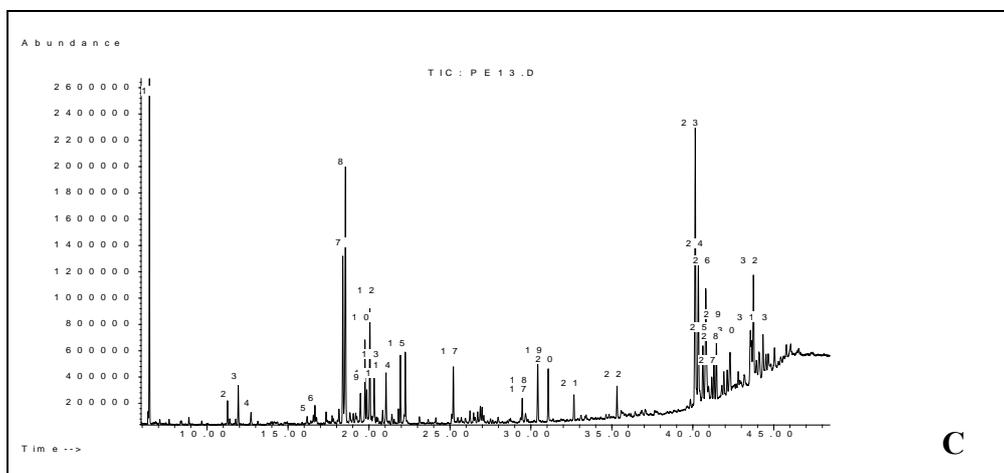
### **3.5. Resultados y discusión de CG-EM**

La CG/EM es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizada para el análisis químico de mezclas complejas, como el caso de un extracto de propóleos. Dicha técnica combina la capacidad de separación de la cromatografía de gases, con el poder de identificación de la espectrometría de masas. El perfil químico obtenido del propóleo facilita el análisis comparativo entre diferentes muestras e incluso puede contribuir a su control de calidad (Vassya Bankova, Bertelli, et al., 2016).

Previo al estudio se somete la muestra a una reacción de derivatización, debido a que los metabolitos mayoritarios no son lo suficientemente volátiles para su análisis por cromatografía de gases (Greenaway, Scaysbrook, & Whatley, 1987). Para realizar este estudio, los extractos se trataron con MSTFA para formar los trimetilsililderivados volátiles. Por tanto, los compuestos con grupos OH presentarán un  $M^+$  con 72 unidades de masas por encima de su masa molecular, por cada grupo OH.

Los cromatogramas gaseosos correspondientes a los extractos totales de las muestras se presentan en la figura 2.





**Figura 2.** Cromatogramas gaseosos obtenidos para la muestras PE-11(A), PE-12(B), PE-13(C)

Elaborado por: (autoras 2018).

Como se puede apreciar en las muestras PE-11 (A), PE-12 (B) y PE-13 (C) se detectaron 30, 37 y 33 picos cromatográficos, respectivamente. Las señales identificadas resultaron ser las de mayor intensidad, para las cuales se obtuvo el espectro de masas por ionización electrónica (IE).

En la tabla 9 se presentan los compuestos químicos que pudieron ser detectados con ayuda de la base de datos (NIST 98), así como sus porcentajes relativos. Los espectros de masas de todos los metabolitos identificados se pueden consultar en los anexos de los espectros de masas.

**Tabla 9.** Compuestos químicos identificados y cuantificados en las muestras de propóleos mediante CG/EM

Tr	Compuestos químicos	PE-11	PE-12	PE-13
6,434	Glicerina	1,624	9,960	9,128
11,267	Ácido málico	-	0,580	0,764
11,925	2,3,4-trihidroxi -1-butanol	0,438	3,210	1,237
12,713	Ácido -2,3,4-trihidroxibutírico	-	0,560	0,487
13,929	Ácido - <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,411	-	-
14,958	$\alpha$ -D-arabinopiranososa	-	0,590	-
16,183	D-xilosa	-	-	0,288
16,667	Xilitol	-	1,050	0,513
18,381	D-fructosa	1,798	5,440	5,823
18,539	Isómero de la D-fructosa	3,665	8,650	10,570
19,467	Azúcar	-	0,910	1,186
19,757	5-desoximioinositol	-	1,660	2,682
19,864	Lactona-2,3,5,6-tetrahidroxigalactónico	-	0,970	1,056
20,050	D-galactosa	1,876	5,050	3,945
20,327	D-glucosa	-	1,050	1,648
21,056	Ácido gálico	-	1,130	1,926
21,935	D-glucosa (isómero)	1,148	3,480	2,336
22,175	Ácido glucónico	-	0,650	-
22,244	Ácido hexadecanoico	2,084	0,910	2,367
23,103	Desconocido	-	0,460	-
24,064	Ácido cafeico	-	0,940	-
24,498	Desconocido	-	3,620	-
25,207	Ácido oleico (ácido 9- octadecenoico)	3,362	1,640	2,069
26,479	Ácido pimárico	1,163	-	-
26,732	Ácido pimárico (isómero)	3,595	-	-
26,889	Ácido pimárico (isómero)	2,003	-	-
28,930	Desconocido	1,825	-	-
29,463	Desconocido	-	-	0,752
29,479	Desconocido	2,489	-	-
30,458	Desconocido	13,182	-	2,310
31,070	Desconocido	-	-	2,026
31,096	Ácido pimárico (isómero)	6,790	-	-
31,341	Desconocido	-	0,520	-
31,809	Desconocido	-	0,960	-
32,238	Desconocido	-	4,220	-
32,644	Desconocido	-	2,700	-
32,651	Octadecilglicerol	-	-	1,012
32,669	Desconocido	2,249	-	-
34,653	Ácido tetracosanoico	0,925	-	-
34,968	Desconocido	-	0,730	-

35,332	Eicosilglicerol	2,407	1,520	1,181
39,861	Lanosterol	-	2,680	-
40,159	Isómero de lupenona	3,403	3,670	12,197
40,347	Desconocido	1,323	1,790	5,451
40,444	Isómero de lanosterol	-	1,530	-
40,645	Triterpeno	0,971	-	2,602
40,791	$\beta$ -amirina	-	8,060	-
40,797	3-Lupenona	-	-	6,644
40,811	4,4,6a,8a,11,11,14b-Octametil-	7,458	-	-
40,963	Isómero de lanosterol	-	3,200	-
41,214	$\alpha$ -amirina	7,830	-	0,923
41,307	Desconocido	-	-	1,970
41,316	Desconocido	-	3,150	-
41,334	Triperpeno (isómero del que eluye en 40,645)	2,957	-	-
41,476	Cicloartenol	1,963	8,390	2,302
41,812	Acetato de $\beta$ -amirina	2,092	-	-
42,128	Desconocido	-	3,000	-
42,173	Ciclolanostano	6,375	-	-
42,301	Desconocido	-	-	2,724
42,309	Acetato de $\alpha$ -amirina	11,052	-	-
43,554	Desconocido	-	-	2,639
43,740	Desconocido	1,540	-	4,984
44,329	Desconocido	-	-	2,263

Elaborado por: (autoras 2017).

Como se puede constatar, las tres muestras se caracterizaron ya que presentan, por debajo de los 21 min., compuestos que forman parte de la composición química general de propóleos recolectados en cualquier zona geográfica. Son, fundamentalmente, compuestos polihidroxilados y azúcares (V. S. Bankova et al., 2000), (de Groot, 2013).

La presencia de polioles y de azúcares es una característica típica de los propóleos, independientemente de su origen geográfico. Haciendo un análisis comparativo, se puede apreciar que la muestra 11 presenta 9,81 % de dichos compuestos, mientras que las dos restantes, 12 y 13, poseen alrededor de 39 % (39,68 y 39,33, respectivamente). Si bien es común la presencia de azúcares en propóleos de diferentes localizaciones (Campo, 2007), (Qian, Khan, Watson, & Fearnley, 2008), la

existencia de porcentajes elevados en las muestras 12 y 13 podrían sugerir la contaminación con la miel durante el proceso de recolección, producto apícola de mayor productividad en la colmena. Debe tenerse en cuenta que la fuente del propóleo difiere del origen de la miel. En este último caso, la abeja toma el néctar de las flores, que se compone, fundamentalmente, de azúcares con predominio de glucosa y fructosa, junto a una mezcla compleja de otros hidratos de carbono, entre otras sustancias de carácter minoritario (Noia et al., 2017).

Posterior a los 21 minutos y hasta los 35 min, se identificaron, fundamentalmente, compuestos con características ácidas, éteres derivados de la glicerina, y algo muy interesante y menos común, que son los diterpenos.

Como coincidencia se encontró que, en las tres muestras, se detectaron los ácidos hexadecanoico, el ácido oleico y el eicosilglicerol. En las muestras 12 y 13 se pudo identificar ácido gálico a un tiempo de retención de 21,056 min, mientras que en la 11 y 13, alrededor de 30,458 min., eluyó un compuesto desconocido. El resto de los metabolitos resultó ser característico de cada uno de los propóleos.

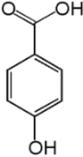
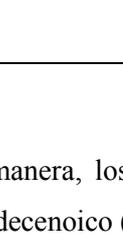
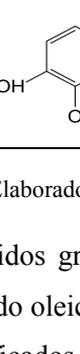
Los compuestos que eluyeron de la columna posterior a los 35 minutos y que pudieron ser identificados por la base de datos, corresponden a metabolitos de naturaleza triterpénica. Los triterpenos se forman biosintéticamente a partir de seis unidades de isopreno por lo que poseen treinta átomos de carbono. El gran número de carbonos que posee hace posible que presenten una gran diversidad estructural, con diferentes cierres de anillo, diversos agrupamientos funcionales tales como hidroxilo, carbonilo, carboxilo y enlaces dobles así como más de cuarenta esqueletos diferentes (Robbers, Speedie, & Tyler, 1996), (Dewick, 2002). Dentro de este tipo de metabolitos, resultaron comunes a las tres muestras un isómero de la 3-lupenona, el cual eluyó alrededor de los 40,159 min., un compuesto que no pudo ser identificado con un tiempo de retención de 40,347 min. y el cicloartenol que eluyó a los 41,476 min.

La base de datos, como se puede apreciar en la tabla 11 no permitió sugerir la estructura de veinte compuestos químicos de intensidad apreciable. Debe tenerse en consideración que la técnica cromatográfica utilizada sugiere, fundamentalmente, masas moleculares y patrones de fragmentación característicos. Para lograr una elucidación estructural exhaustiva, lo ideal sería realizar un proceso de purificación mediante columna y, posteriormente, el empleo de métodos de caracterización como por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (RMN) para los compuestos aislados.

La presencia de fenoles simples como el ácido-*p*-hidroxibenzoico, el ácido gálico y el ácido cafeico ha sido informada con anterioridad en muestras de propóleos (Greenaway, Scaysbrook, & Whatley, 1990), (Velikova, Bankova, Marcucci, Tsvetkova, & Kujumgiev, 2000), (Jeong, Bae, Lee, & Shim, 2003), (José M Sforcin et al., 2005), (Sahinler & Kaftanoglu, 2005), (Paula, Estevinho, & Dias, 2017).

Como se puede apreciar en la tabla 10, las señales correspondientes a los iones, fragmentos obtenidos para cada uno de los compuestos, se corresponde con lo informado por la literatura (K. Zhang & Zuo, 2004), (Plessi, Bertelli, & Miglietta, 2006), (Proestos & Komaitis, 2013).

**Tabla 10.** Estructura de los fenoles simples identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos

Tr (min.)	Compuesto	m/z / [M] <sup>+</sup> o ion fragmento
13,929	 ácido- <i>p</i> -hidroxibenzoico	282 / [M] <sup>+</sup> 267 / [M - CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 193 / [M - TMSO] <sup>+</sup> 105 / [M - TMSO-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
21,056	 ácido gálico	458 / [M] <sup>+</sup> 443 / [M - CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 369 / [M - TMSO] <sup>+</sup> 281 / [M - TMSO-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
24,054	 ácido cafeico	396 / [M] <sup>+</sup> 381 / [M - CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 307 / [M - TMSO] <sup>+</sup> 219 / [M - TMSO-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>

Elaborado por: (autoras 2017).

De igual manera, los ácidos grasos como el hexadecanoico (ácido palmítico, C16:0), el 9-octadecenoico (ácido oleico C18:1), y el tetracosanoico (ácido lignocérico C24:0) también han sido identificados en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Markham, Mitchell, Wilkins, Dalby, & Lu, 1996), (Greenaway et al., 1990), (Sahinler & Kaftanoglu, 2005).

Estudios químicos realizados en muestras de propóleos de diferentes localizaciones han mostrado la existencia de ácidos grasos como el ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, araquidónico, oleico, linoleico,  $\alpha$ -linoleico, 9-octadecanoico, eicosenoico y el ácido behénico, entre otros, lógicamente en variadas proporciones (Silici & Kutluca, 2005), (Christov et al., 2006), (Tamfu et al., 2016), (Al-Ghamdi et al., 2016), (Rebiai et al., 2017).

Las señales que caracterizaron los espectros de masas de los ácidos grasos se muestran en la tabla 11 y, de igual forma, estuvieron en total correspondencia con lo reportado en la literatura (Proestos & Komaitis, 2013).

**Tabla 11.** Estructura de los ácidos grasos identificados e interpretación de los fragmentos fundamentales obtenidos

Tr (min.)	Compuesto	m/z / [M] <sup>+</sup> o ion fragmento
22,244	Ácido hexadecanoico (ácido palmítico, C16:0)	328 / [M] <sup>+</sup> 313 / [M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 145 / [CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 132 / Reordenamiento de McLafferty 117 / [M-COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
25,207	Ácido 9-octadecenoico (ácido oleico C18:1)	354 / [M] <sup>+</sup> 339 / [M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 145 / [CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 132 / Reordenamiento de McLafferty 117 / [M-COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
34,653	Ácido tetracosanoico (ácido lignocérico C24:0)	440 / [M] <sup>+</sup> 425 / [M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 145 / [CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 132 / Reordenamiento de McLafferty 117 / [M-COOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>

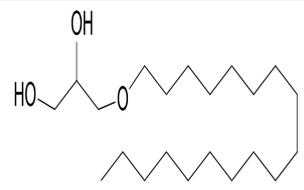
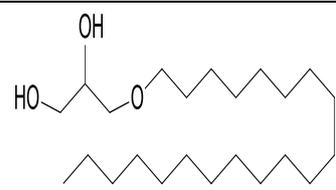
Elaborado por: (autoras 2017).

La comparación con la base de datos sugirió la estructura de dos éteres de glicerilo, identificados como el éter octadecilglicerol y su homólogo superior de veinte átomos de carbono (Benveniste, Mangold, & Paltauf, 1983), describieron la fragmentación por ionización electrónica que sufren los 1-O-alkuil-2,3-di-OTMS gliceroles, donde se plantea que el ion M<sup>+</sup> casi no se aprecia.

Los espectros de masas muestran la presencia de iones provocados por pérdidas de 15, 90, 103 y 147 Da (para los derivados con 16 – 18 átomos de carbono, fundamentalmente). El pico base del espectro de estos compuestos es m/z 205 y se aprecian iones que derivan de ese fragmento.

La identificación que se desarrolló para ambos compuestos; se resume en la tabla 12.

**Tabla 12.** Interpretación del espectro correspondiente a los éteres de glicerilo identificados

Tr (min.)	Estructura del compuesto	m/z	[M] <sup>+</sup> o ion fragmento
32,651	 Octadecilglicerol	488	M <sup>+</sup>
		473	[M-15] <sup>+</sup>
		398	[M-90] <sup>+</sup> (-OH, -TMS)
		385	[M-103] <sup>+</sup> (-CH <sub>2</sub> -OTMS)
		341	[M-147] <sup>+</sup> (TMSO-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> )
		205	[TMSO-CH <sub>2</sub> -CH-OTMS] <sup>+</sup>
		147	[TMSO-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
		133	
		130	
		117	
35,332	 Eicosilglicerol	516	M <sup>+</sup>
		501	[M-15] <sup>+</sup> (-CH <sub>3</sub> )
		426	[M-90] <sup>+</sup> (-OH, -TMS)
		369	[M-147] <sup>+</sup> (TMSO-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> )
		205	[TMSO-CH <sub>2</sub> -CH-OTMS] <sup>+</sup>
		147	[TMSO-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>
		133	
		130	
		117	

Elaborado por: (autoras 2017).

La presencia de éteres de glicerilo ha sido referida en muestras de propóleos. Dos ejemplos recientes lo constituyen los reportes realizados en muestras de propóleos de Camerún y Argelia, donde se encontraron monogliceril éteres al igual que en este estudio (Talla et al., 2017), (Soltani et al., 2017).

Los picos cromatográficos con tiempo de retención en 26,47; 26,73; 26,88 y 31,09 min. (muestra PE-11) mostraron espectros de masas muy similares, caracterizados por un pico base a  $m/z$  73 y un ion molecular a  $m/z$  374. Las principales diferencias detectadas estuvieron relacionadas con la intensidad de algunos iones fragmentos. El pico cromatográfico en 26,47 min. fue relacionado, por la base de datos, con el ácido pimárico. Este y otros ácidos diterpénicos isómeros que poseen núcleos del pimarano, isopimarano y abietano poseen una masa molecular de 302 Da. Al tener en cuenta que los extractos de propóleos fueron derivatizados con MSTFA previo al análisis por CG/EM, se justifica la diferencia de 72 Da entre la masa observada en este estudio y la masa de los diterpenos sin derivatizar.

Los picos asociados con los diterpenos mostraron un porcentaje combinado superior al 12 %, por lo que se consideró oportuno discutir sus espectros de masas para confirmar la propuesta realizada por la base de datos del equipo.

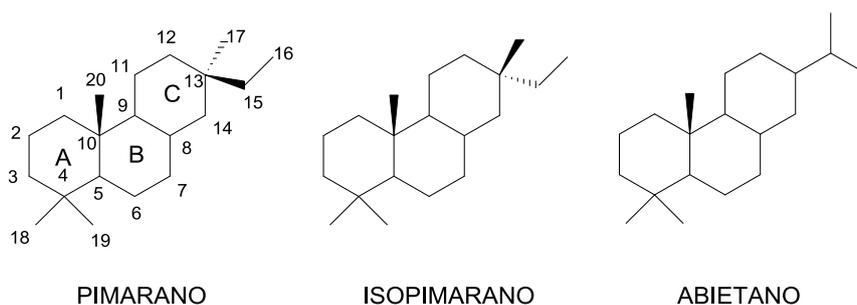
Los estudios relacionados con el comportamiento de los diterpenos en espectrometría de masas, empleando la ionización electrónica como modo de ionización, fueron desarrollados entre 1965 y 1975, fundamentalmente (C R Enzell & Wahlberg, 1969), (Chang, Mead, & Zinkel, 1971), (Curt R Enzell, Wahlberg, & Gunnarsson, 1974).

En el caso particular de los ácidos diterpénicos, los estudios fueron realizados con los metil éteres y no con los trimetil silil derivados obtenidos en este trabajo. Sin

embargo, se realizará la discusión teniendo en cuenta la literatura disponible y la diferencia estructural mencionada.

Los espectros de masas de los cuatro compuestos mostraron que la fragmentación principal ocurre por la pérdida del grupo trimetilsilil, ya que, en todos los casos, el ion fragmento de mayor intensidad se aprecia a  $m/z$  73. Resulta evidente que este comportamiento no puede ser apreciado en los metil ésteres reportados en la literatura y, por lo tanto, no existirá coincidencia, respecto al pico base, entre los derivados detectados en este estudio y los derivados empleados en los estudios previos de fragmentación.

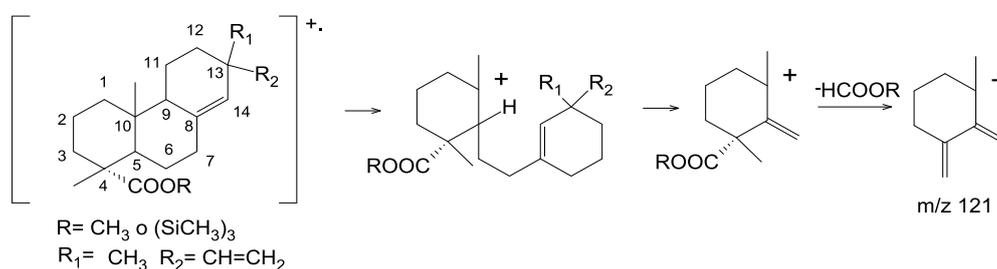
Los núcleos de diterpenos tricíclicos derivados del pimarano, isopimarano y abietano han sido detectados con anterioridad en propóleos y, por ello, el análisis estructural se centrará en ellos. Para que estos núcleos tricíclicos originen un ion molecular en  $m/z$  374, además del grupo carboxilo, deben contener dos enlaces dobles entre átomos de carbono (Fig. 3). Se conoce que la posición de estos enlaces dobles en la estructura tricíclica influye en el modo de fragmentación de dichos compuestos (C R Enzell & Wahlberg, 1969), (Chang et al., 1971), (Curt R Enzell et al., 1974).



**Figura 3.** Estructura y nomenclatura de tres núcleos de diterpenos reportados en propóleos

Elaborado por: (autoras 2017).

(Chang et al., 1971) establecieron que el patrón de fragmentación en espectrometría de masas de 8(14),15-pimaradienoatos, 8(14),15-isopimaradienoatos y los correspondientes 8(14)-monoenoatos es similar. Como una de las posibles fragmentaciones, se sugirió la ruptura del enlace alílico C9-C10, seguido de un reordenamiento de Mc Lafferty y por último la pérdida del grupo carboximetil, para dar origen al ion fragmento m/z 121 (Fig. 4).



**Figura 4.** Mecanismo de fragmentación propuesto por (Chang et al., 1971) para derivados de pimaradienoatos, isopimaradienoatos y sus 8(14)-monoenoatos

Elaborado por: (Chang et al., 1971).

El ion fragmento m/z 121, asociado a la pérdida del metanoato que sustituye la posición 4 del núcleo, está demostrada para los metil ésteres. En el caso de ocurrir en los trimetilsilil derivados conduciría al mismo ion fragmento. En los espectros de masas de los cuatro compuestos, se apreció este fragmento y su intensidad fue mayor para el compuesto con tiempo de retención 26,73 min. Varios diterpenos ácidos con masa molecular 302 Da (374 Da como trimetilsilil derivados) poseen un  $\Delta^{8,14}$  y, por tal motivo, podría originar el ion fragmento m/z 121. Estos isómeros difieren en la estereoquímica del C-13 o en la fusión de anillos B/C (*cis* o *trans*), y dan lugar a varios estereoisómeros entre los que se pueden citar los ácidos: pimárico, isopimárico, neoabietico y levopimárico. Asimismo, otros diterpenos comunes como el ácido abietico y el palústrico presentan la misma masa de los compuestos antes mencionados.

El espectro de masas del compuesto con tiempo de retención 26,73 min. (Anexo 1), donde se observaron con mayor intensidad algunas señales, fue escogido para justificar otros iones fragmentos que evidencian la naturaleza diterpénica de los compuestos analizados. El ion fragmento  $m/z$  359 fue relacionado con la pérdida de un grupo metilo, lo cual es consistente con las estructuras propuestas. Asimismo, el pico en  $m/z$  257 difiere en 117 Da respecto al ion molecular ( $m/z$  374) y puede asociarse con la pérdida del residuo del éster trimetil silil ( $-\text{COOSi}(\text{CH}_3)_3$ ); lo que corrobora la presencia de un grupo carboxilo en el compuesto sin derivatizar. Esta última fragmentación es similar a la pérdida del grupo  $\text{COOCH}_3$  de los metil ésteres informados con anterioridad (Chang et al., 1971). La señal en  $m/z$  241 difiere en 118 Da respecto al ion fragmento  $m/z$  359, sugiriendo la pérdida del grupo  $\text{HCOOSi}(\text{CH}_3)_3$ . De esta forma, se confirma la presencia de un grupo carboxilo y el resultado también es congruente con la pérdida del grupo  $\text{HCOOCH}_3$  observada en los metil ésteres de ácidos diterpénicos (Chang et al., 1971).

Las afirmaciones anteriores indican que, en la muestra de propóleos PE-11, se presentan varios ácidos diterpénicos, ya que los espectros de masas son consistentes con las propuestas realizadas. Sin embargo, realizar una asignación inequívoca para los picos cromatográficos con tiempo de retención en 26,47; 26,73; 26,88 y 31,09 min resulta arriesgado; ya que muchos de estos compuestos son estereoisómeros y no fue posible comparar los espectros de masas obtenidos con los espectros de sustancias de referencia.

Algunos grupos de investigadores han informado la presencia de diterpenos en propóleos de diferentes orígenes geográficos. Inicialmente (V Bankova et al., 1996), reportaron la presencia de estos compuestos en muestras de propóleos procedentes de Brasil, lo que hizo relacionar la presencia de diterpenos con los propóleos tropicales.

Sin embargo, dos grupos de investigadores aislaron y caracterizaron estructuralmente diterpenos en muestras de propóleos procedentes de Europa, en particular de Grecia y Sicilia (Vassya Bankova, Popova, Bogdanov, & Sabatini, 2002), (Melliou & Chinou, 2004). Estos compuestos ocasionalmente han sido detectados en propóleos colectados en Turquía y Algeria.

Los diterpenos como los ácidos pimarico, isopimarico, abiético, entre otros, parecen ser constituyentes característicos de algunas muestras de propóleos del Mediterráneo, europeo y africano. Se ha propuesto que la fuente vegetal que origina dicha composición química son árboles de coníferas pertenecientes a Cupressaceae y Pinaceae, dos familias de plantas con amplia distribución en la zona Mediterráneo (T. Zhang et al., 2014), (Kalogeropoulos et al., 2009), (Melliou & Chinou, 2004), (Milena P Popova, Chinou, Marekov, & Bankova, 2009), (Milena Petkova Popova et al., 2010), (M. Popova et al., 2011), (M. Popova et al., 2012).

(Graikou, Popova, Gortzi, Bankova, & Chinou, 2016) analizaron la composición química de 32 muestras de propóleos recolectadas en zonas del Mediterráneo incluyendo Grecia, Chipre, Croacia y Argelia; a través de un estudio de cromatografía gaseosa acoplada a masas. En la mayoría de las muestras se detectaron diterpenos cuyos valores de abundancia relativa estuvieron entre 0,7 y 80,4 % de la corriente iónica total, siendo las muestras procedentes de diferentes islas griegas las que mayor porcentaje mostraron. Los diterpenos identificados en ese estudio fueron: ácido isocupressico, ácido pimarico, agathadiol, totarol y el ácido comunico.

A partir de los 39 min, se detectaron triterpenos tetracíclicos tipo lanostano y pentacíclicos derivados de lupano, oleanano y ursano. Se identificaron al lanosterol, la  $\beta$ -amirina y su acetato, la 3-lupenona, el cicloartenol y la  $\alpha$ -amirina y su acetato. Otros triterpenos fueron detectados pero no pudieron ser identificados partir de esta técnica, lo cual resulta lógico tomando en consideración las limitantes de este procedimiento y

la complejidad estructural de estos metabolitos, algo que ya fue explicado con anterioridad.

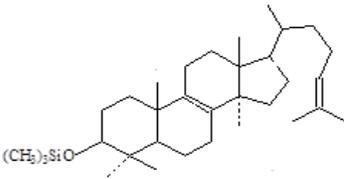
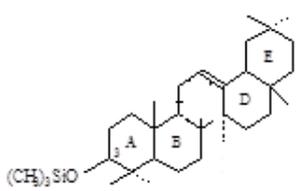
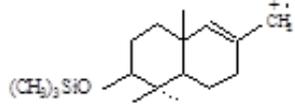
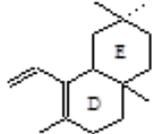
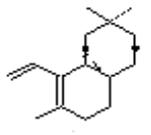
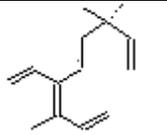
El lanosterol y el cicloartenol son triterpenos derivados del lanostano. Las rupturas fundamentales que presentan se encuentran relacionadas con la pérdida de la cadena lateral de la posición 17, la pérdida del sustituyente sobre la posición 3 y fragmentaciones que involucraron pérdidas de  $\text{CH}_3$  y  $\text{C}_3\text{H}_7$ . En el caso de presentar el anillo de ciclopropano entre las posiciones 9 y 19, se observan señales relacionadas con la pérdida de este (Audier, Beugelmans, & Das, 1966), (Fernandes-Ferreira, Novais, Salome, & Pais, 1990).

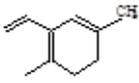
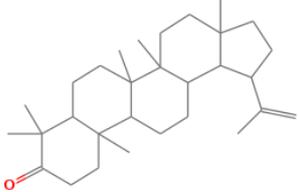
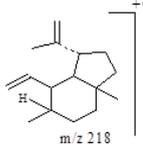
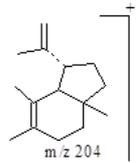
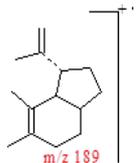
La  $\beta$ -amirina y su acetato se clasifican como oleananos  $\Delta^{12}$  insaturados y la  $\alpha$ -amirina y su acetato como ursanos  $\Delta^{12}$  insaturados. El patrón de fragmentación característico de este tipo de compuestos se describe mediante una reacción rDA sobre el anillo C, para dar el fragmento que permite definir las sustituciones sobre los anillos D y E. Al restar de la masa molecular la masa de este fragmento se pueden determinar los sustituyentes que se encuentran sobre los anillos A y B. Otras rupturas menos probables tienen lugar para dar fragmentos de menor intensidad (Budzikiewicz, Wilson, & Djerassi, 1963). El espectro de masas de estos dos núcleos muestra solo una diferencia, relacionada con las intensidades relativas que presentaron los fragmentos  $m/z$  203 y 189. El primero de ellos fue más intenso que el segundo para la  $\beta$ -amirina, y para la  $\alpha$ -amirina el comportamiento fue contrario, coincidiendo con lo que se reporta en la literatura (Karlner & Djerassi, 1966).

La 3-lupenona es un triterpeno pentacíclico derivado del lupano. El espectro de masas de esta serie se caracteriza por presentar como fragmentos más abundantes aquellos productos de la ruptura del anillo C. Se observaron, además, los fragmentos correspondientes a las pérdidas de metilo e isopropilo. Esta última es característica de este tipo de núcleo (Budzikiewicz et al., 1963), (Heinzen et al., 1996).

La tabla 13 muestra, de manera resumida, la interpretación de los principales fragmentos obtenidos para los triterpenos identificados.

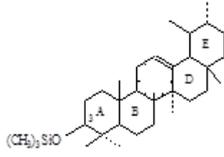
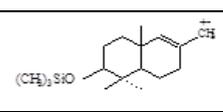
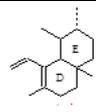
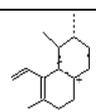
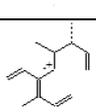
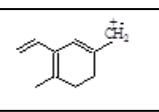
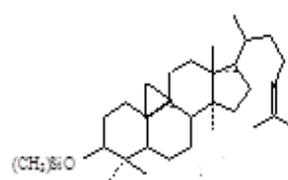
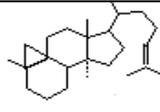
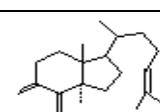
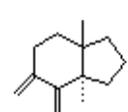
**Tabla 13.** Interpretación de los principales fragmentos obtenidos para los triterpenos identificados

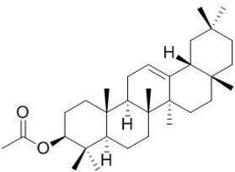
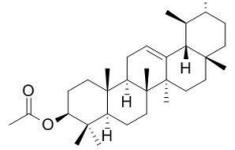
Tr (min)	Estructura del triterpeno	Iones fragmento m/z	Interpretación
39,86 1	 Lanosterol	498	M <sup>+</sup>
		483	[M - 15] <sup>+</sup> (-CH <sub>3</sub> )
		393	[M - 15, -90] <sup>+</sup> (-CH <sub>3</sub> ; -OTMS)
40,79 1	 β-amirina	498	M <sup>+</sup>
		279	
		218	
		203	
		189	

		133	
40,79 7	 3-Lupenona	424	$M^+$
		409	$[M-15]^+ (-CH_3)$
		381	$[M-43]^+ (-CH(CH_3)_2)$
		218	 m/z 218
		204	 m/z 204
		189	 m/z 189

Elaborado por: (autoras 2017).

**Tabla 14.** Interpretación de los principales fragmentos obtenidos para los triterpenos identificados

Tr (min)	Estructura del triterpeno	Iones fragmento m/z	Interpretación
41,214	 <p><math>\alpha</math>-amirina</p>	498	M <sup>+</sup>
		279	
		218	
		203	
		189	
		133	
41,476	 <p>Cicloartenol</p>	498	M <sup>+</sup>
		408	[M - 90] <sup>+</sup> (- OTMS)
		393	[M - 15, -90] <sup>+</sup> (-CH <sub>3</sub> ; - OTMS)
		365	408 - 43, (-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )
		339	
		286	
		175	

41,812	 Acetato de $\beta$ -amirina	468	$M^+$
		218, 203, 189, 133	La misma dada para la $\beta$ -amirina
42,309	 Acetato de $\alpha$ -amirina	468	$M^+$
		203, 189, 133	La misma dada para la $\alpha$ -amirina

Elaborado por: (autoras 2017).

Los triterpenos poseen una amplia distribución en especies vegetales de diferentes familias, que a su vez crecen en los más diversos orígenes geográficos. Por tal motivo, la presencia de triterpenos es muy común en muestras de propóleos e incluso llegan a ser los constituyentes mayoritarios de las mismas. En Cuba se identificó un tipo de propóleos donde los triterpenos, tanto como alcoholes como acetatos, constituyen los compuestos principales (Márquez Hernández et al., 2010). En diferentes países de prácticamente todos los continentes se han reportado triterpenos ya sea como constituyentes minoritarios o mayoritarios. Las diferencias fundamentales, asociadas al origen geográfico, parecen estar más relacionadas con el tipo particular de triterpenos; sin embargo, algunos triterpenos como la amirina y el lupeol se encuentran ampliamente representados en propóleos (V. S. Bankova et al., 2000), (de Groot, 2013), (Y. K. Park et al., 2002).

La presencia de ácidos diterpénicos en muestras de propóleos del Ecuador sugiere que especies de coníferas, de manera similar a como ocurre en algunos países con costas en el Mediterráneo, podrían constituir la fuente vegetal que visitan las abejas para la producción de propóleos. Este resultado apunta hacia la variabilidad que, en cuanto a composición química, pueden mostrar los propóleos nacionales. En un estudio realizado

con propóleos ecuatorianos procedentes de Cotacachi, Quito y Guayaquil, se determinó la presencia de flavonoides y triterpenos como componentes principales de dichas muestras (Cuesta-Rubio et al., 2017). Es decir, hasta el momento se han identificado tres familias de metabolitos secundarios como componentes principales de muestras de propóleos ecuatorianos. Al tener en cuenta la amplia variedad de flora que presenta nuestro país, se puede inferir la posibilidad de que se detecten otros componentes principales en muestras procedentes de diferentes orígenes geográficos.

Existen estudios realizados con extractos naturales, cuyos marcadores químicos pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos, donde se ha demostrado actividad antimicrobiana. Por ejemplo, en la especie *Lawsonia inermis*, la presencia de ácido gálico justifica su actividad contra *Streptococcus aureus*. Estudios en extractos de *Thymus vulgaris*, por su concentración en ácido cafeico, timol y taninos, han demostrado poseer actividad antiviral, antibacterial y antimicótica. De manera similar, se identificaron metabolitos derivados del ácido cafeico en *Artemisia dracuncululus*, los que propician la actividad antiviral y antihelmíntica de la especie (MÁRQUEZ, Galeano, & Martínez, 2003).

Son múltiples los estudios que relacionan el contenido de compuestos fenólicos con la actividad antimicrobiana del propóleo. Marcadores químicos de este producto apícola como el ácido ferúlico y el ácido cafeico, contribuyen a la acción bactericida del propóleo (Teixeira, Negri, Salatino, Stringheta, & others, 2010), (José Mauricio Sforcin & Bankova, 2011), (Cardinault, Cayeux, & du Sert, 2012), (L. de L. de Oliveira et al., 2014).

De igual manera los ácidos grasos como el hexadecanoico (ácido palmítico, C16:0), el 9-octadecenoico (ácido oleico C18:1), y el tetracosanoico (ácido lignocérico C24:0) también han sido identificados en muestras de propóleos de diferentes orígenes

geográficos (Greenaway et al., 1990), (Markham et al., 1996), (Sahinler & Kaftanoglu, 2005).

Estudios químicos realizados en muestras de propóleos de diferentes localizaciones han mostrado la existencia de ácidos grasos como el ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, araquidónico, oleico, linoleico,  $\alpha$ -linoleico, 9-octadecanoico, eicosenoico y el ácido behénico, entre otros, lógicamente en variadas proporciones (Al-Ghamdi et al., 2016), (Christov et al., 2006), (Rebiai et al., 2017), (Silici & Kutluca, 2005), (Tamfu et al., 2016).

Según (Sati, Sati, Sati, & Sati, 2017), luego de un análisis por CG/EM de extractos de los frutos del *Quercus leucotrichophora* (roble blanco) se demostró la presencia de gran cantidad de ácidos grasos saturados e insaturados. Dichos extractos demostraron actividad antibacteriana contra bacterias Grampositivas y en menor medida bacterias Gramnegativas.

Varios diterpenos con el núcleo pimarano, aislados de *Viguiera arenaria* Baker, mostraron valores de concentraciones mínimas inhibitorias de 2 a 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  frente a los principales agentes de caries dentales: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* and *Lactobacillus casei* (Porto et al., 2009). Por otra parte, 5 diterpenos aislados de propóleos de Creta mostraron un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias y hongos (Milena, Popova et al., 2009).

Los dos ejemplos anteriores sugieren que los diterpenos pueden contribuir a la actividad antimicrobiana de las muestras de propóleos que los contengan.

La actividad antimicrobiana no es lo que más se destaca dentro de la familia de los triterpenos. (Madureira et al., 2003) demostró una fuerte actividad inhibitoria contra los virus de herpes simplex 1 y 2 para la lupenona y (Katerere, Gray, Nash, & Waigh, 2003)

encontraron que el ácido imberbico (triterpeno tipo oleanano) presentaba una fuerte actividad antibacteriana contra *Bacterium fortuitum* y *Staphylococcus aureus*.

Otros autores demostraron el efecto sinérgico de triterpenos pentacíclicos frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, el efecto débil de la  $\beta$ -amirina contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* y el efecto antimicrobiano de las amirinas contra la bacteria Gram negativa *Pseudomonas syringae* (Chung, Navaratnam, & Chung, 2011), (Hernández-Vázquez, Palazon, & Navarro-Ocaña, 2012), (Mallavadhani, Mahapatra, Jamil, & Reddy, 2004).

(Wolska, Grudniak, Fiecek, Kraczkiewicz-Dowjat, & Kurek, 2010) demostró que el ácido oleánico, el ursónico y sus derivados eran activos frente a varias especies de bacterias Gram positivas incluidas microbacterias.

Como puede apreciarse en las tres muestras de propóleos, no existe un metabolito que pudiera considerarse el mayoritario en sentido absoluto, por lo que los beneficios terapéuticos o efectos biológicos de estas son adjudicados a la mezcla de todos los compuestos químicos anteriormente caracterizados por CG-EM. Precisamente, el valor o la mayor bondad que ofrecen los extractos naturales es, precisamente, que la combinación de diversos metabolitos activos hace al extracto un fitoterapéutico de mayor eficacia que algunos de sus fitoconstituyentes por individual. La mezcla de varios metabolitos activos puede ejercer un efecto sinérgico que hace del extracto un producto de mayor potencia que algunos de los fitoconstituyentes por individual.

Adicionalmente, pudiera ser más asimilable por el organismo y provocar menores efectos adversos.

Existe actualmente, una tendencia a la preferencia de productos cosméticos de origen natural y está dado precisamente por las ventajas que los mismos ofrecen, por ser mezclas activas de composición análoga a los productos del metabolismo humano, por lo que suelen ser menos irritantes, mejor absorbidas y poseen menor cantidad de efectos secundarios.

### **3.6. Determinación de la CMI de las muestras de estudio frente a diferentes cepas bacterianas mediante la técnica de microplacas**

Se utilizaron cuatro cepas de bacterias: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Propionibacterium acnes* para el desarrollo de metodología.

#### **3.6.1. Inoculo bacteriano**

Se empleó una cepa por cada bacteria de estudio, sembrada el día anterior a 37 °C en medio de cultivo específico para su crecimiento. Posteriormente, se esterilizaron tubos de ensayo con medio líquido agua de peptona por caja bacteriana. Finalmente, se preparó el inoculo bacteriano tomando una parte del cultivo hasta ajustar la turbidez de la suspensión de ensayo al estándar de McFarland 0,5, correspondiente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

#### **3.6.2. Control positivo**

Para llevar a cabo la técnica, se emplearon controles positivos para cada uno de los microorganismos de estudio; siendo estos: Amikacina 500 mg (*Pseudomonas aeruginosa*), Ciprofloxacino 200 mg (*Staphylococcus aureus*), ciprofloxacino 200 mg (*Escherichia coli*) y Clindamicina 600 mg (*Propionibacterium acnes*).

### 3.6.3. Microdilución

Siguiendo la metodología descrita por (Navarro-Navarro et al., 2012) en las microplacas de 96 pocillos se colocó en las primeras seis columnas el inóculo bacteriano con los propóleos P11 y P12, y en los tres pocillos siguientes el antibiótico respectivo; en los tres restantes, se añadió sólo el inóculo bacteriano. Cabe mencionar que, para P13, se lo realizó en una nueva microplaca siguiendo las mismas pautas que las anteriores. Es necesario recalcar que todo el procedimiento se lo realizó por triplicado con la finalidad de obtener datos más precisos.

Referente a las concentraciones de las tres muestras de propóleos e inóculos bacterianos, se implementó el método de doble dilución, iniciando con una concentración de propóleos al 25 % (30mg/mL.) en la fila A y terminando con una concentración del 0,2 % (0,23mg/mL.) en la fila H, como se describe a continuación en la tabla 15:

**Tabla 15.** Tratamientos dados en la microplaca

<b>FILA</b>	<b>MÉTODO DOBLE DILUCIÓN</b>
F1, F2, F3- P-11	30 mg/mL., 15 mg/mL., 7,5 mg/mL., 3,75 mg/mL., 1,88 mg/mL., 0,94 mg/mL. 0,47 mg/mL. 0,23 mg/mL.
F4, F5, F6- P12	30 mg/mL., 15 mg/mL., 7,5 mg/mL., 3,75 mg/mL., 1,88 mg/mL., 0,94 mg/mL. 0,47 mg/mL. 0,23 mg/mL.
F1, F2,F3 – P-13	30 mg/mL., 15 mg/mL., 7,5 mg/mL., 3,75 mg/mL., 1,88 mg/mL., 0,94 mg/mL. 0,47 mg/mL. 0,23 mg/mL.
F7, F8, F9	Control positivo (antibiótico)
F10, F11,F12	Control negativo (inóculo bacteriano)

Elaborado por: (autoras 2017).

Alcanzado el tiempo de incubación, se procedió a leer las microplacas en el equipo lector de microplacas marca MRC, empleando una longitud de onda de 450 y 630 nm.

### 3.6.4. Resultados y discusión

Para establecer la concentración mínima inhibitoria de los extractos de propóleos frente a las diferentes bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Propionibacterium acnes*, se obtuvo un promedio por cada tratamiento, considerando que la metodología se realizó por triplicado; dichos resultados se detallan a continuación en la tabla 16 y para determinar si existe una significancia estadística de la actividad antibacteriana de las tres muestras de propóleos de diferentes concentraciones frente a las bacterias de estudio, se realizó un DCA, Anova y diagrama de cajas a través el programa estadístico MINITAB 17.

**Tabla 16.** Valores de la concentración mínima bactericida obtenidos al evaluar las tres réplicas los extractos etanólicos obtenidos de los diferentes propóleos sobre *E. coli*, *P. acnes*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Concentración mínima inhibitoria ( mg/mL.)				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>
PE-11	3,75	3,75	1,88	3,75
PE-12	1,88	1,88	1,88	1,88
PE-13	1,88	3,75	3,75	7,5

Elaborado por: (autoras 2017).

Para determinar la concentración mínima se grafican las diferentes concentraciones de los propóleos 11, 12 y 13 con las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro medida a 630 y 450 nm.

En el caso de *Propionibacterium acnes* se puede apreciar el siguiente comportamiento:

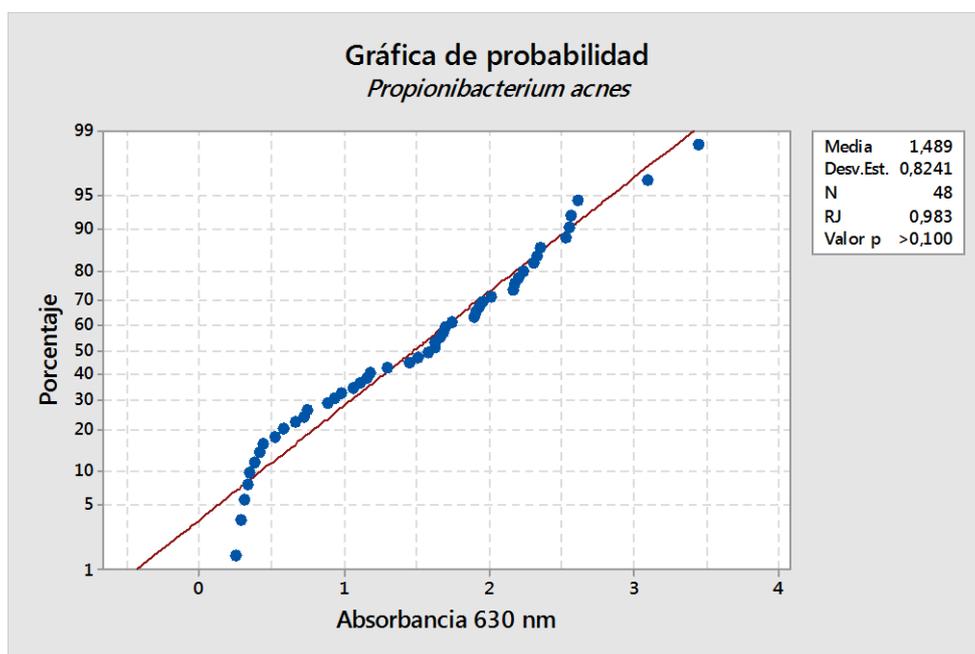


Figura 5. Gráfica de Normalidad, tiempo 0/ 24 h. P. acnes

Elaborado por: (autoras 2017).

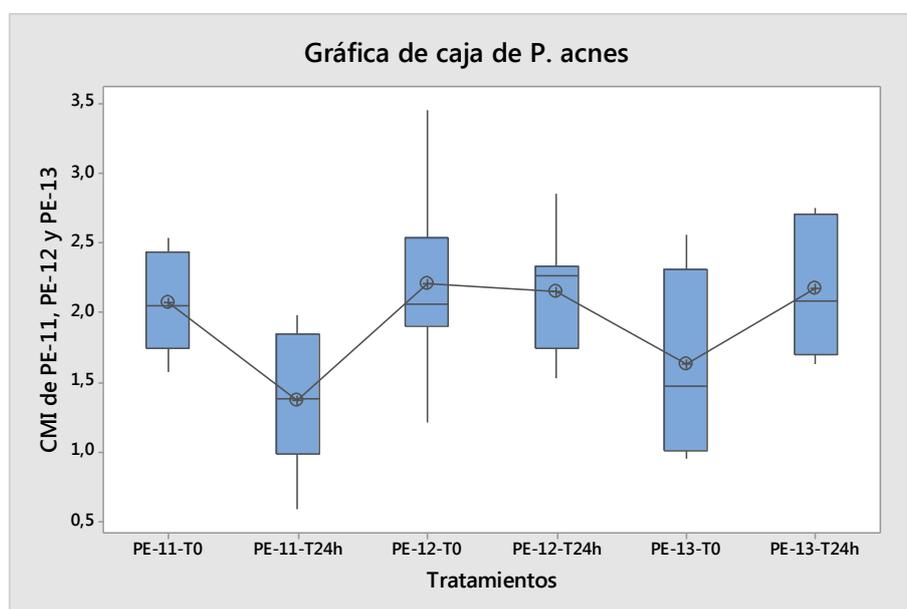
En la figura 5, se puede demostrar que el valor  $p > 0,100$  obtenido en el tiempo 0 y a las 24 h mediante la prueba de Ryan-Joiner, es mayor al valor de significancia de 0,05; estableciendo que todos los datos se encuentran dentro del rango del supuesto de normalidad, lo que nos permite ejecutar el Diseño Completamente al Azar (DCA).

**Tabla 17.** DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a *P. acnes*; tiempo 0 y 24 h

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	7	18,45	2,6352	7,82	0,001
Error	40	13,48	0,3369		
Total	47	31,92			

Elaborado por: (autoras 2017).

En la tabla 17, se observa los resultados obtenidos del análisis de varianza del DCA, en donde el valor p 0,001 es menor al valor de significancia 0,05; razón por la cual se establece que los propóleos PE-11, PE-12 y PE-13 poseen propiedades antibacterianas contra *P. acnes*.

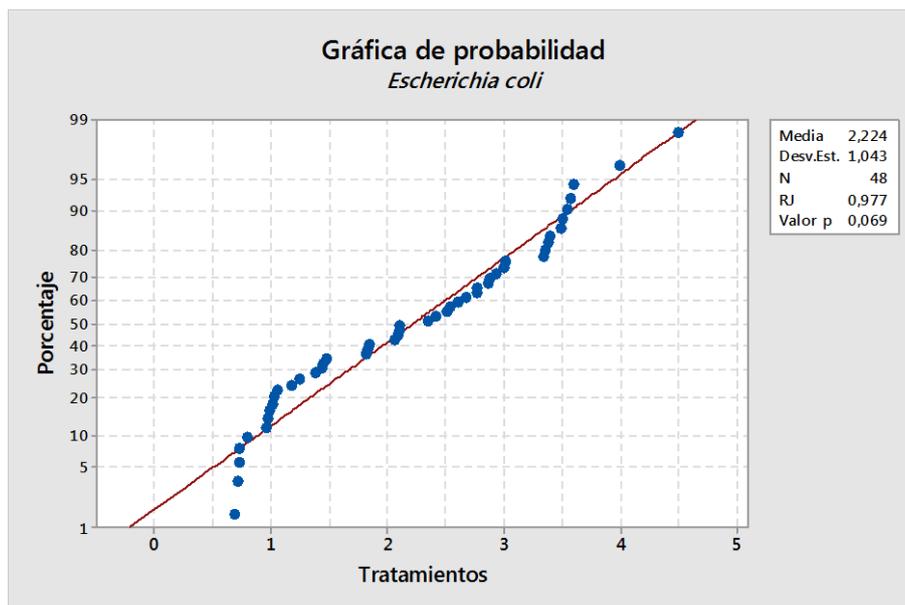


**Figura 6.** Diagrama de cajas; CMI de *P. acnes*

Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 6, se puede establecer que en los tratamientos PE-11-T0 y PE-11-T24h cuyas medias son 2,07 y 1,36 presentan una variación entre sus medias, estableciendo que la CMI para el PE-11 es 1,88 mg/mL. De igual manera, podemos expresar que, para los tratamientos PE-12-T0 y PE-12-T24 h, existe variación en sus medias de 2,21 y 2,14, siendo la CMI para PE-12 de 1,88 mg/mL. Para PE-13-T0 y PE-13-T24 h las medias son 1,62 y 2,17, señalando que la CMI para PE-13 es de 3,75 mg/mL., tomando en consideración que para PE-13-T24 h el nivel de absorbancia aumentó; pudiendo concluir que el PE-11 y PE-12 presenta mayor actividad de inhibición frente al *P. acnes*, pero no existe una diferencia significativa entre los tres tipos de propóleos.

En el caso de *Escherichia coli* podemos observar el siguiente comportamiento:



**Figura 7.** Gráfica de Normalidad, tiempo 0/ 24 h. *E. coli*

Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 7, se puede demostrar que el valor p 0,069 obtenido en el tiempo 0 y a las 24 h mediante la prueba de Ryan-Joiner, es mayor al valor de significancia de 0,05;

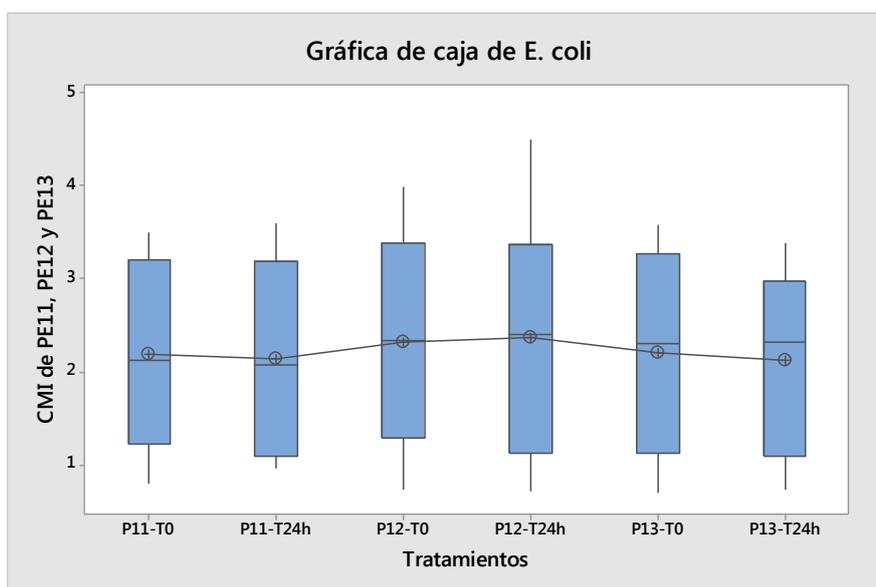
estableciendo que todos los datos se encuentran dentro del rango del supuesto de normalidad, lo que nos permite ejecutar el Diseño Completamente al Azar (DCA).

**Tabla 18.** DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a *E. coli*; tiempo 0/ 24 h

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	9,857	1,8961	6,72	0,048
Error	41	13,48	0,3369		
Total	47	29,92			

Elaborado por: (autoras 2017).

En la tabla 18, se observa los resultados obtenidos del Análisis de Varianza del DCA, en donde el valor p 0,048 es menor al valor de significancia 0,05; razón por la cual se establece que los propóleos PE-11, PE-12 y PE-13 poseen propiedades antibacterianas contra *E. coli*.

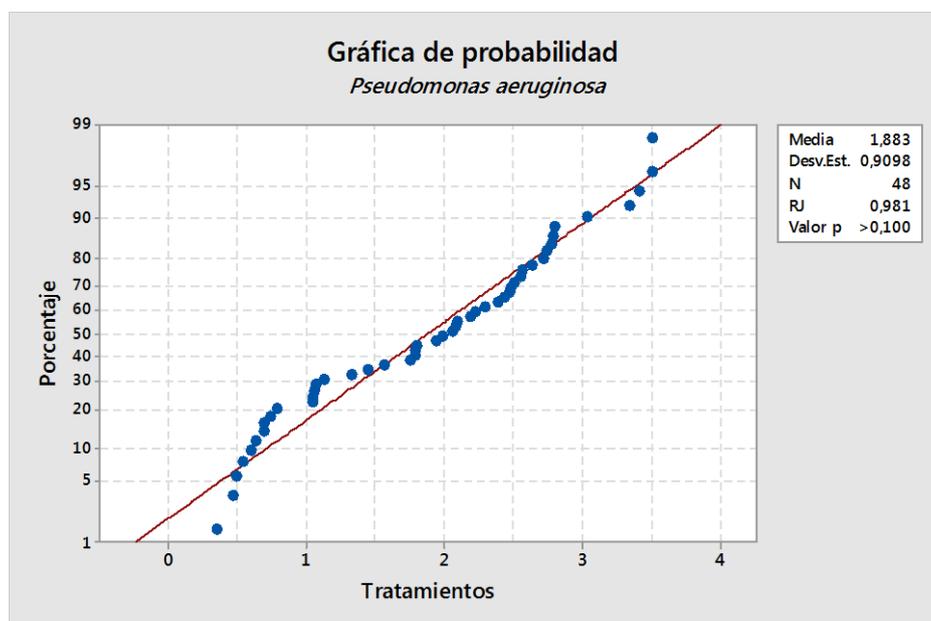


**Figura 8.** Diagrama de cajas; CMI de *E. coli*

Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 8, se puede observar que, para los tratamientos PE-11-T0 y PE-11T24 h, cuyas medias son 2,19 y 2,13, presentan una variación entre sus medias, estableciendo que la CMI para el PE-11 es 3,75 mg/mL.. De igual manera, podemos expresar que, para los tratamientos PE-12-T0 y PE-12-T24 h, existe variación en sus medias de 2,31 y 2,37, siendo la CMI para PE-12 de 1,88 mg/mL.. Para PE-13-T0 y PE-13T24 h las medias son 2,20 y 2,13, señalando que la CMI para PE-13 es de 1,88 mg/mL., tomando en consideración que PE-12 y PE-13 presentan mayor actividad de inhibición frente al *E. coli*.

- *Pseudomona aeruginosa*



**Figura 9.** Gráfica de normalidad tiempo 0/ 24 h. *P. aeruginosa*

Elaborado por: (autoras 2017).

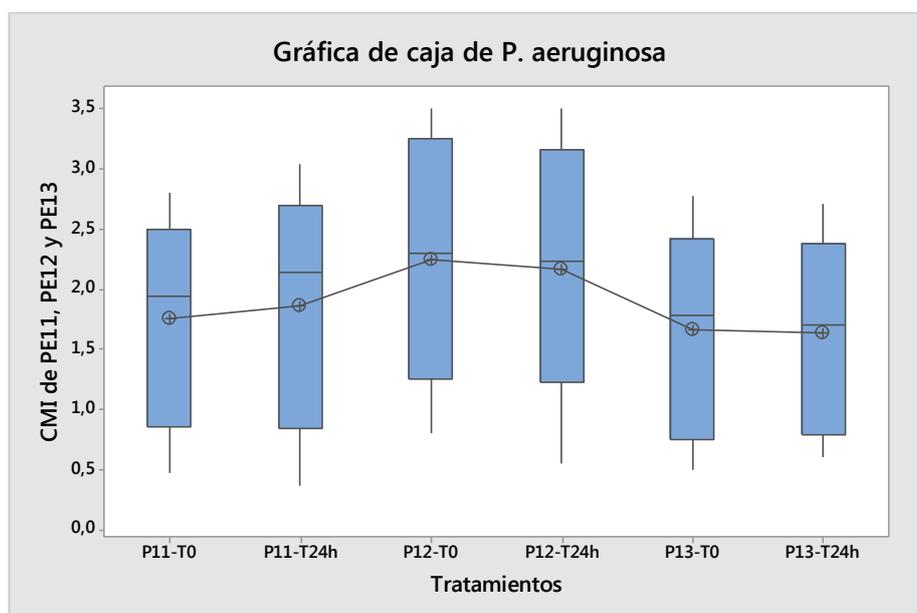
En la figura 9, se puede demostrar que el valor  $p > 0,100$  obtenido en el tiempo 0 y a las 24 h mediante la prueba de Ryan-Joiner, es mayor al valor de significancia de 0,05; estableciendo que todos los datos se encuentran dentro del rango del supuesto de normalidad, lo que nos permite ejecutar el Diseño Completamente al Azar (DCA).

**Tabla 19.** DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a *P. aeruginosa*; tiempo 0/ 24 h

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	2,694	0,5389	0,63	0,002
Error	41	36,206	0,8620		
Total	47	18,902			

Elaborado por: (autoras 2017).

En la tabla 19, se observan los resultados obtenidos del Análisis de Varianza del DCA, en donde el valor p 0,002 es menor al valor de significancia 0,05; razón por la cual se establece que los propóleos PE-11, PE-12 y PE-13 poseen propiedades antibacterianas contra *P. aeruginosa*.

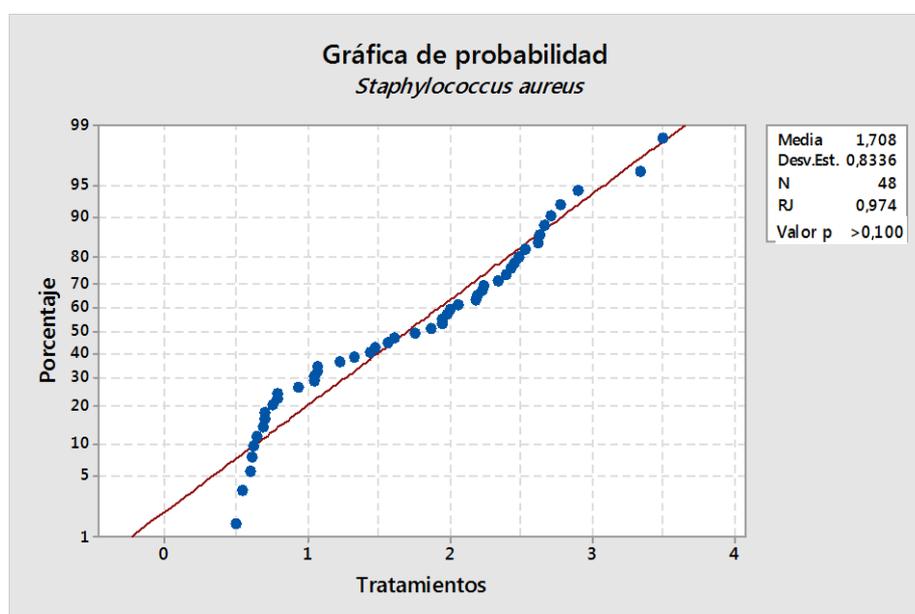


**Figura 10.** Diagrama de cajas; CMI de *P. aeruginosa*

Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 10, se puede observar que, para los tratamientos PE-11-T0 y PE-11T24 h, cuyas medias son 1,75 y 1,85, presentan una variación entre sus medias, estableciendo que la CMI para el PE-11 es 3,75 mg/mL. De igual manera, podemos expresar que, para los tratamientos PE-12-T0 y PE-12-T24 h, existe variación en sus medias de 2,25 y 2,16, siendo la CMI para PE-12 de 1,88 mg/mL. Para PE-13-T0 y PE-13T24 h, las medias son 1,66 y 1,63, señalando que la CMI para PE-13 es de 3,75 mg/mL., tomando en consideración que PE-13 presenta mayor actividad de inhibición frente al *P. aeruginosa*.

- ***Staphylococcus aureus***



**Figura 11.** Gráfica de normalidad, tiempo 0/ 24 h. *S. aureus*

Elaborado por: (autoras 2017).

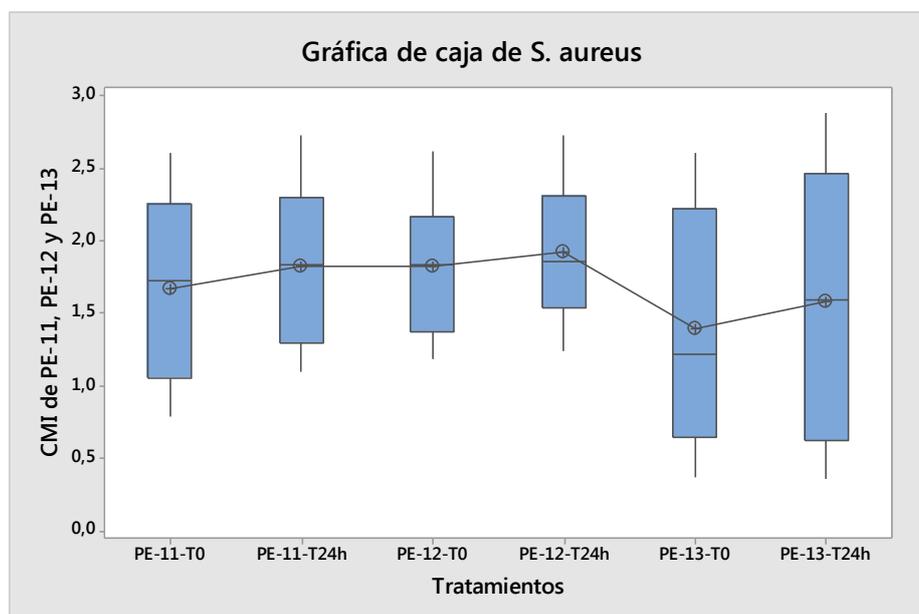
En la figura 11, se puede demostrar que el valor  $p > 0,100$  obtenido en el tiempo 0 y a las 24 h mediante la prueba de Ryan-Joiner, es mayor al valor de significancia de 0,05; estableciendo que todos los datos se encuentran dentro del rango del supuesto de normalidad, lo que nos permite ejecutar el Diseño Completamente al Azar (DCA).

**Tabla 20.** DCA de PE-11, PE-12 y PE-13 frente a *S. aureus*; tiempo 0/ 24 h

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	16,04	3,2072	8,967	0,001
Error	42	15,03	0,3578		
Total	47	31,06			

Elaborado por: (autoras 2017).

En la tabla 20, se observa los resultados obtenidos del Análisis de Varianza del DCA, en donde el valor p 0,002 es menor al valor de significancia 0,05; razón por la cual se establece que los propóleos PE-11, PE-12 y PE-13 poseen propiedades antibacterianas contra *S. aureus*.



**Figura 12.** Diagrama de cajas; CMI de *S. aureus*

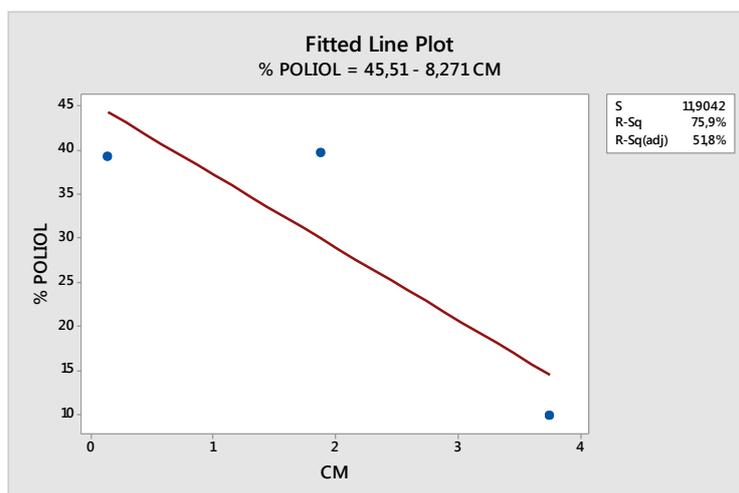
Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 12, se puede observar que para los tratamientos PE-11-T0 y PE-11T24 h cuyas medias son 0,96 y 0,99 presentan una variación entre sus medias, estableciendo que la CMI para el PE-11 es 3,75 mg/mL. De igual manera, podemos expresar que para los tratamientos PE-12-T0 y PE-12-T24 h existe variación en sus medias de 0,13 y 0,13, siendo la CMI para PE-12 de 1,88 mg/mL. Para PE-13-T0 y PE-13T24 h las medias son 1,64 y 1,58, señalando que la CMI para PE-13 es de 7,50 mg/mL. Tomando en consideración que PE-12 presenta mayor actividad de inhibición frente al *S. aureus*.

Resultados obtenidos de PE-11, PE-12, PE-13, cada uno frente a las bacterias *E. coli*, *P. acnes*, *P. aeruginosa* y *S.aureus*, mediante el método estadístico ANOVA; estableciendo la muestra de propóleos con mayor actividad inhibitoria (CMI) frente a las bacterias de estudio.

### 3.6.5. Relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química

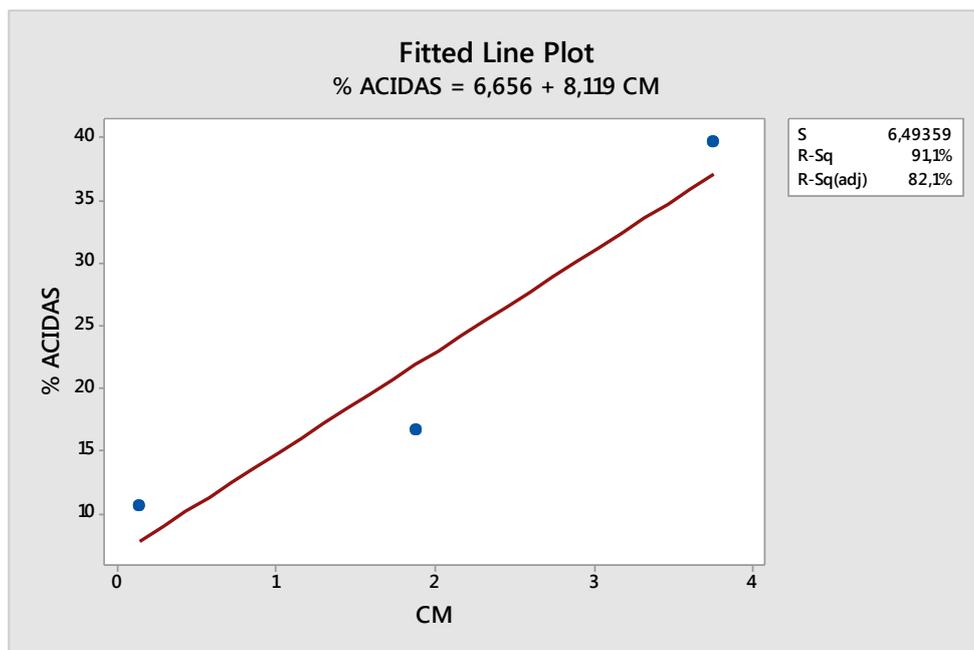
En la figura 13 se puede observar un gráfico que relaciona la CMI de los extractos estudiados con la composición química del grupo de polioles.



**Figura 13.** Relación entre la CMI y el porcentaje de polioles en las muestras

Elaborado por: (autoras 2017).

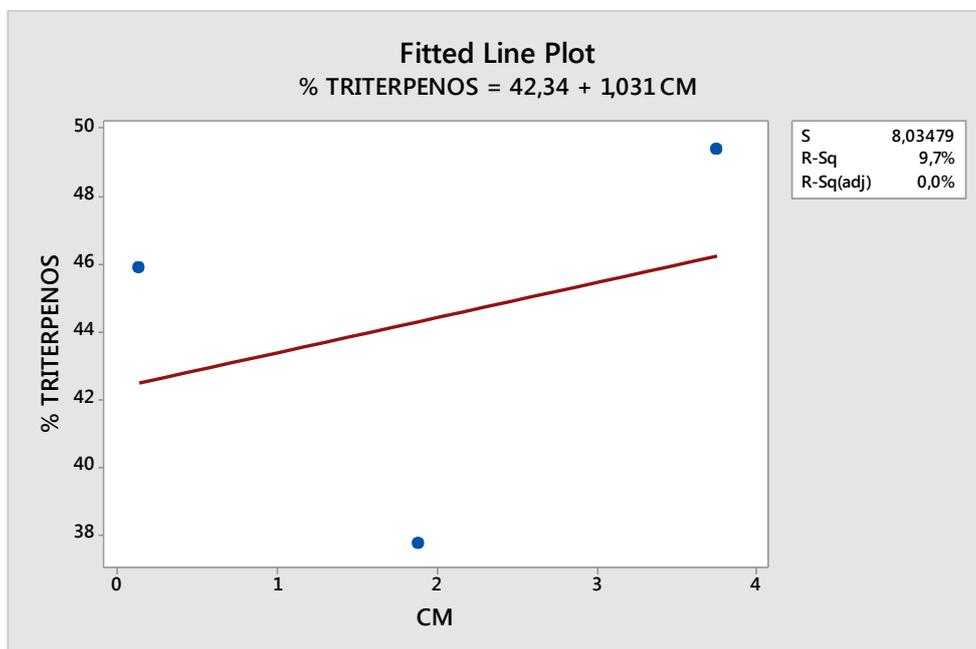
En la figura 14 se puede observar un gráfico que relaciona la CMI de los extractos estudiados con la composición química del grupo de ácidos, éteres de glicerina, diterpenos.



**Figura 14.** Relación entre la CMI y el porcentaje de ácido, ester de glicerina y diterpenos en las muestras

Elaborado por: (autoras 2017).

En la figura 15 se puede observar un gráfico que relaciona la CMI de los extractos estudiados con la composición química del grupo de triterpenos.



**Figura 15.** Relación entre la CMI y el porcentaje de triterpenos en las muestras

Elaborado por: (autoras 2017).

Analizando los gráficos anteriores, el contenido de los grupos triterpénico no tiene ninguna relación con la capacidad antibacteriana, pues los valores obtenidos de  $r$  son de 0, no sucede con el contenido de fenoles, diterpenos, ácido, ésteres de glicerina con la capacidad antibacteriana cuyo valores de  $r$  es de 82,1 y 58, por lo tanto, podemos decir que a medida que el porcentaje de grupos triterpenicos aumenta, la capacidad antibacteriana disminuye.



## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

La CG-EM permitió establecer la composición química para las tres muestras estudiadas. Se pudieron detectar azúcares, polioles, ácidos fenólicos simples, ácidos grasos, estructuras terpénicas (diterpenos y triterpenos) así como otras no identificadas por la base de datos.

Los estudios realizados por CCD mostraron que las tres muestras de propóleos, aunque siendo de diferente localización geográfica desde el punto de vista cualitativo, no presentan un perfil químico similar, al menos bajo las condiciones cromatográficas empleadas, por lo que se decidió llevar a cabo CG-EM.

La cuantificación relativa llevada a cabo mediante CG-EM mostró que no existe un metabolito secundario mayoritario en ninguna de las muestras, por lo que la efectividad terapéutica o efecto biológico se asocia a la mezcla de los diversos compuestos químicos identificados.

Los resultados obtenidos para CMI de las tres muestras de propóleo mostraron que el PE-11 que proviene de la provincia del Azuay es más sensible para *Propionibacterium acnes* y presenta una actividad similar frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Mientras que el PE-12 presenta la misma actividad frente a las cuatro cepas objeto de estudio con una CMI de 1,88 mg/mL.

*Staphylococcus aureus* resultó la especie bacteriana más resistente, ya que necesitó la mayor concentración de PE-13. Actualmente, es una bacteria que presenta mayor resistencia frente a muchos antibióticos. *Escherichia coli* es más sensible para PE-13, con una CMI de 1,88mg/mL..

Los propóleos tendrán mayor actividad antibacteriana mientras menor sea el porcentaje de extracto utilizado.

#### **4.1. RECOMENDACIONES**

Profundizar los estudios químicos realizados con el objetivo de identificar, mediante otras técnicas cromatográficas y espectroscópicas de mayor alcance, los componentes desconocidos en dichas muestras.

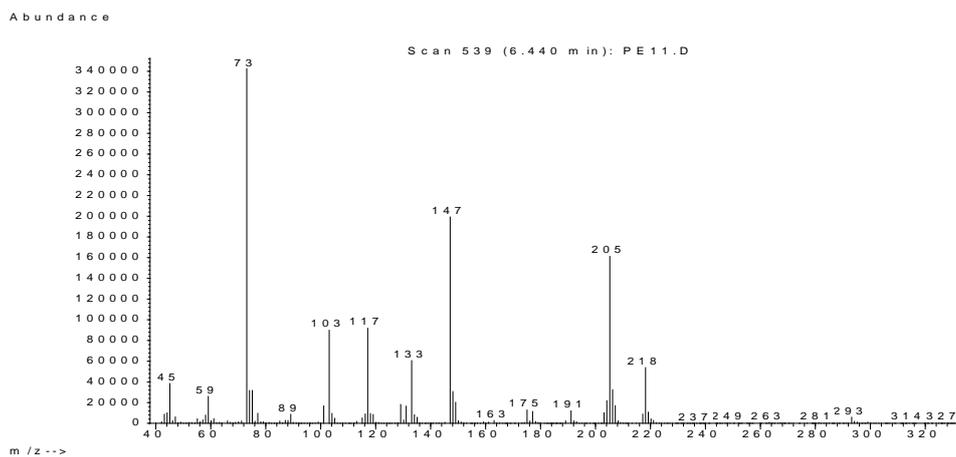
Ampliar los estudios antibacterianos en otras cepas microbianas, sobre todo, aquellas que sean más susceptibles de contaminar las preparaciones cosméticas.

En Ecuador la apicultura no está muy desarrollada por lo cual el costo de esta materia prima es alto, por tal motivo sería poco factible realizar formulaciones cosméticas usando extracto de propóleos solo como conservantes. No obstante, se podría valorar el uso en la formulación junto a otros principios activos o excipientes que actúen de manera sinérgica.

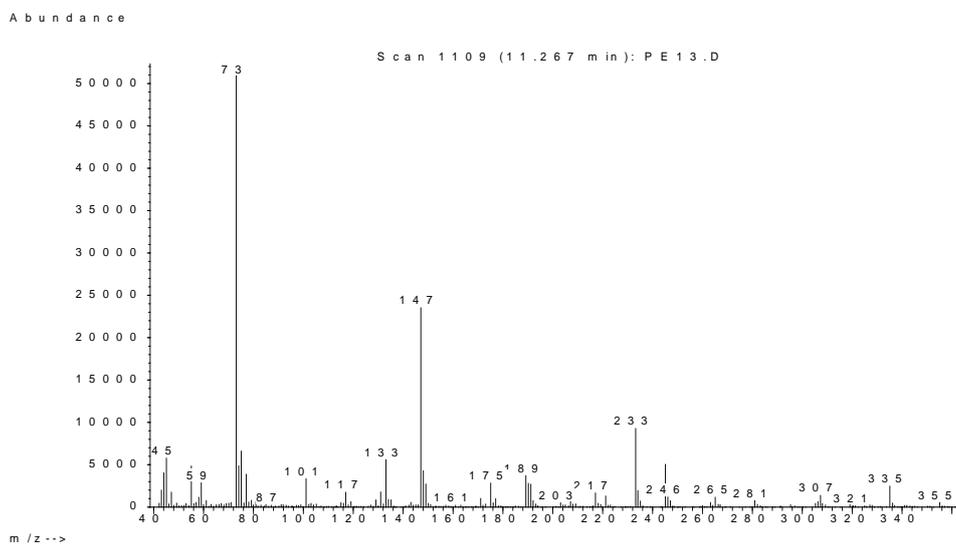
Incrementar la divulgación del propóleos y sus efectos beneficiosos para aumentar la producción del mismo.

# ANEXOS

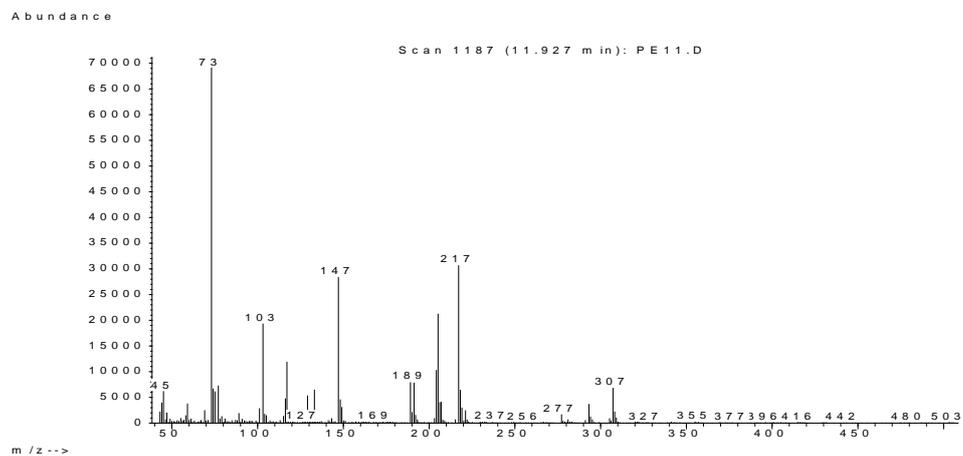
## Anexo 1. Espectro de masas de la glicerina



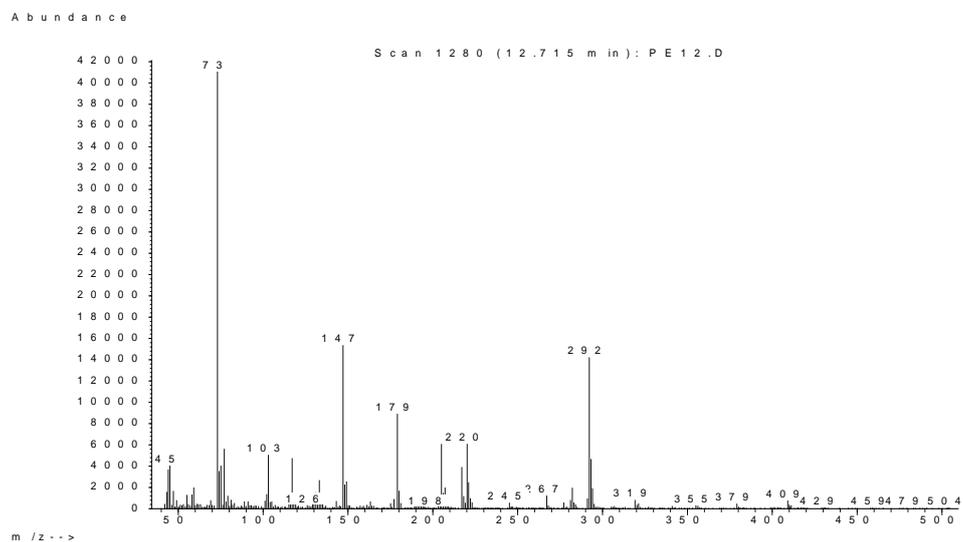
## Anexo 2. Espectro de masas del ácido málico



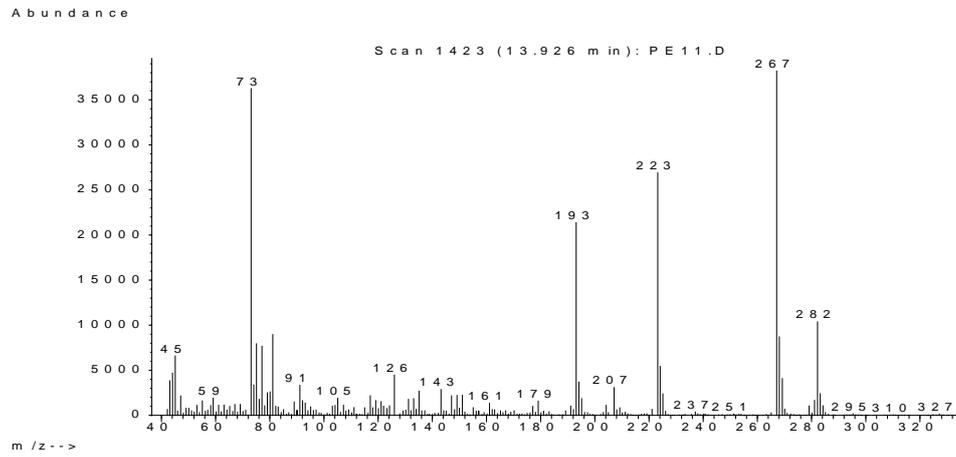
### Anexo 3. Espectro de masas del 2, 3, 4-trihidroxi -1-butanol



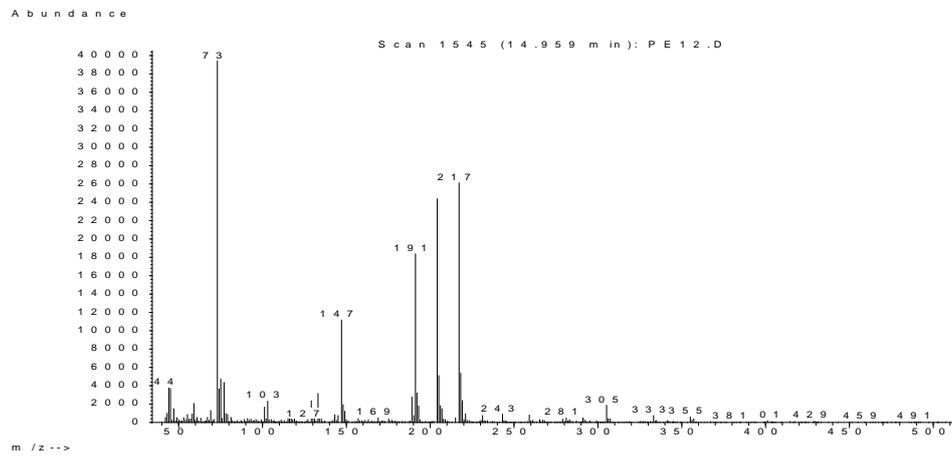
### Anexo 4. Espectro de masas de la Ácido -2, 3, 4-trihidroxi-butírico



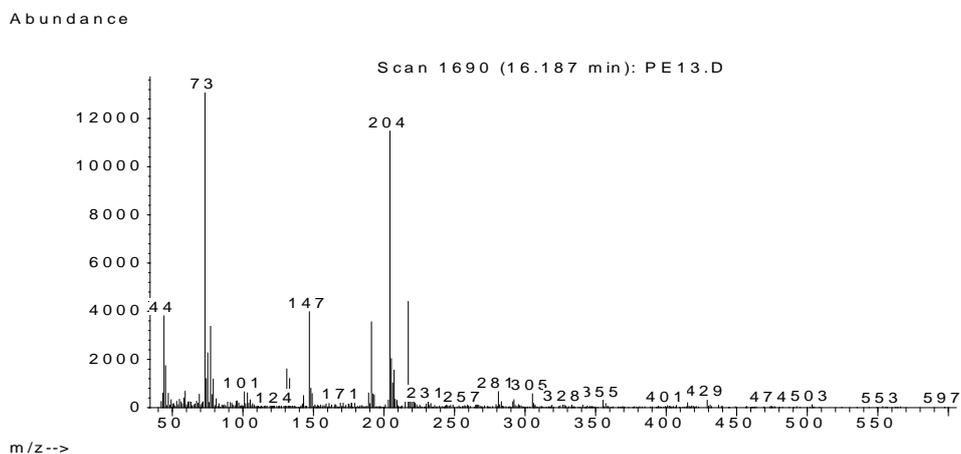
### Anexo 5. Espectro de masas del ácido *p*-hidroxibenzoico



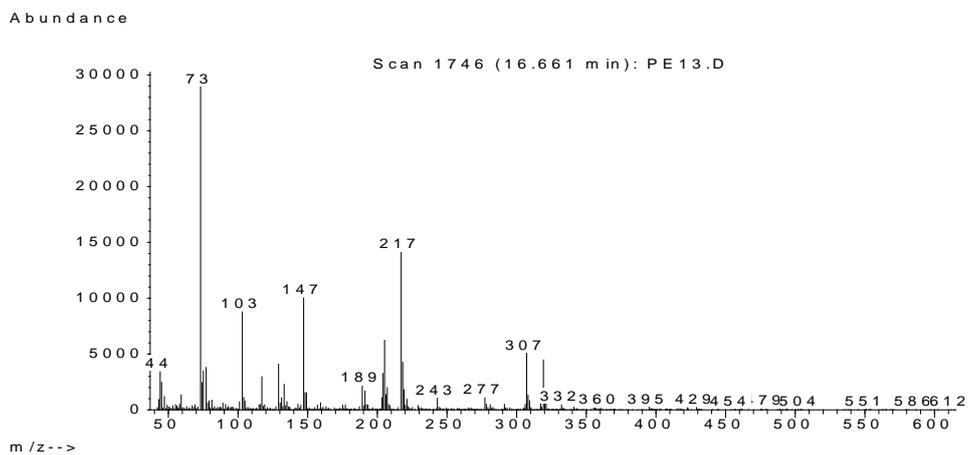
### Anexo 6. Espectro de masas del $\alpha$ -D-arabinopiranos



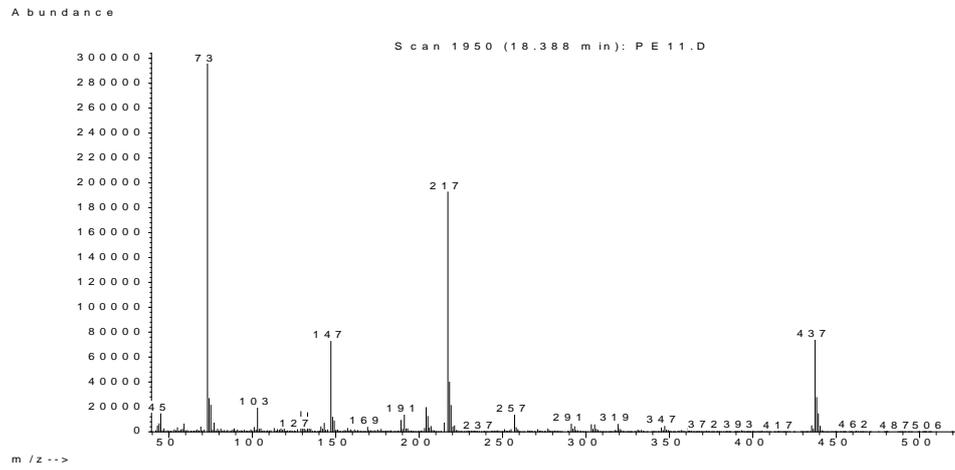
### Anexo 7. Espectro de masas del D-Xilosa



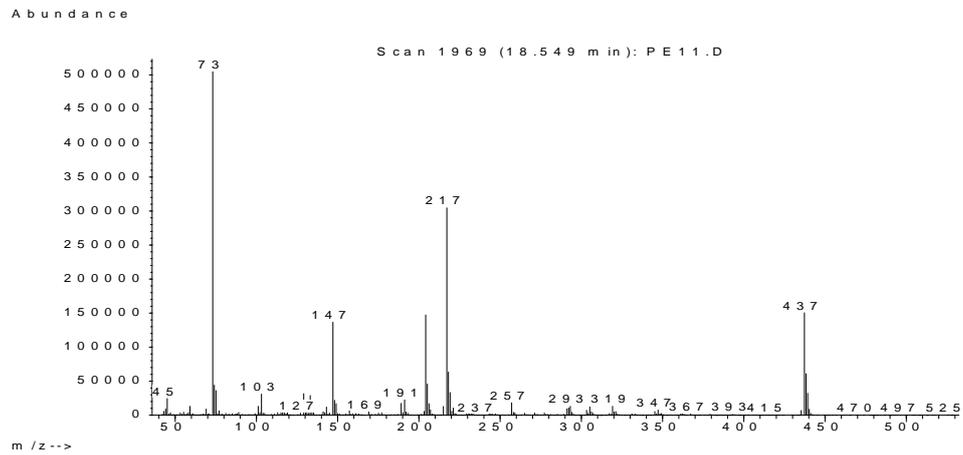
### Anexo 8. Espectro de masas del Xilitol



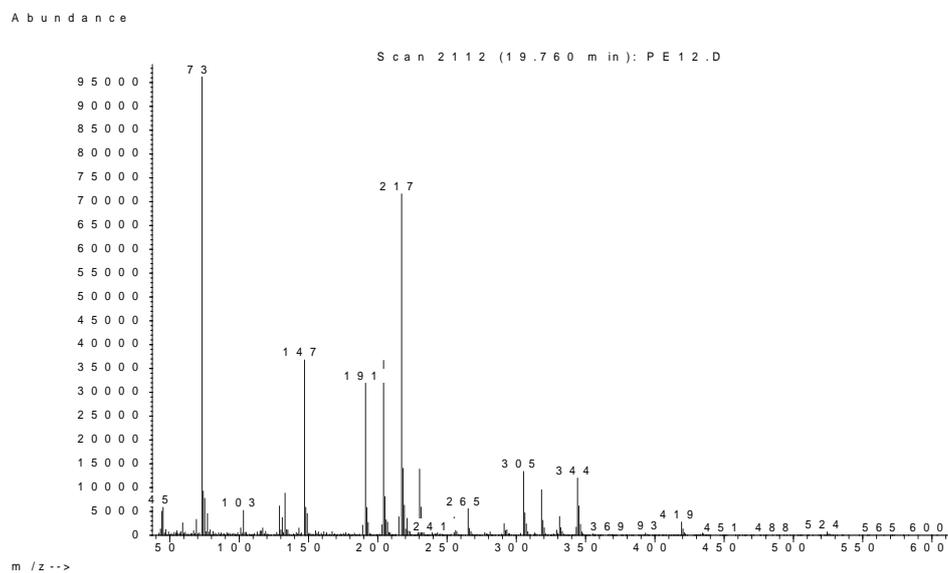
### Anexo 9. Espectro de masas de la D-Fructosa



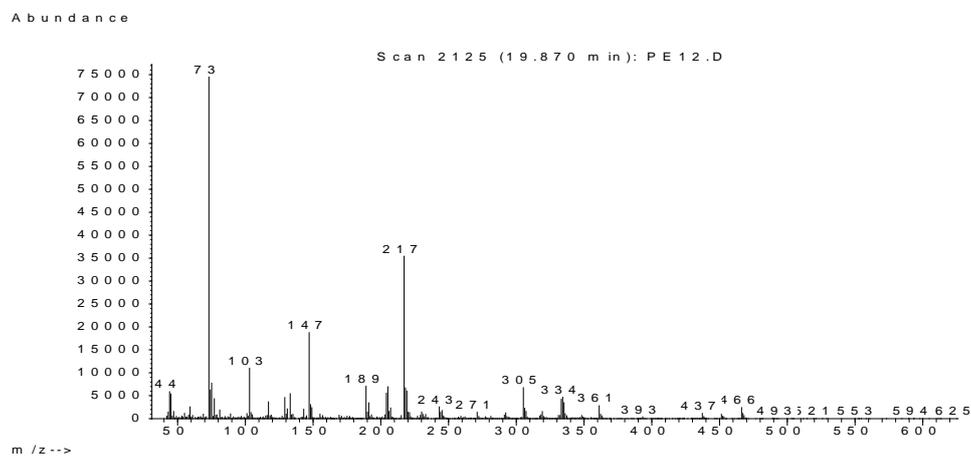
### Anexo 10. Espectro de masas de la D-Fructosa (isómero)



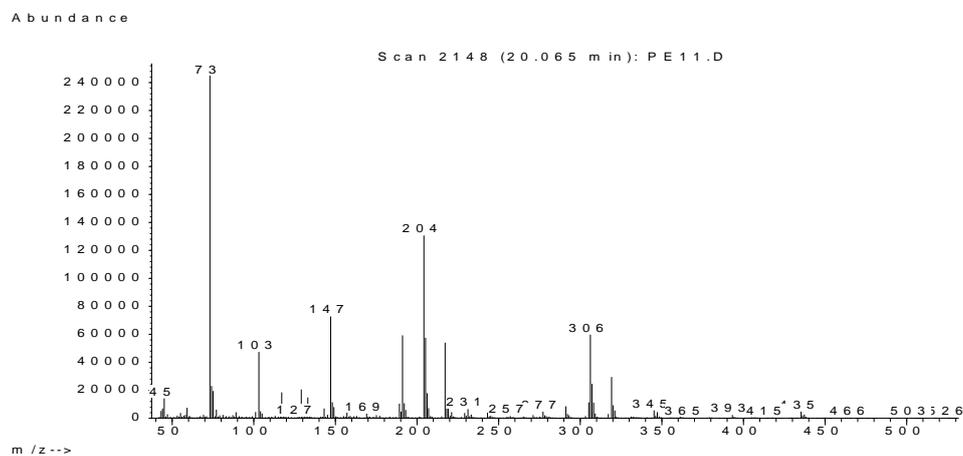
### Anexo 11. Espectro de masas del Desoximiinositol



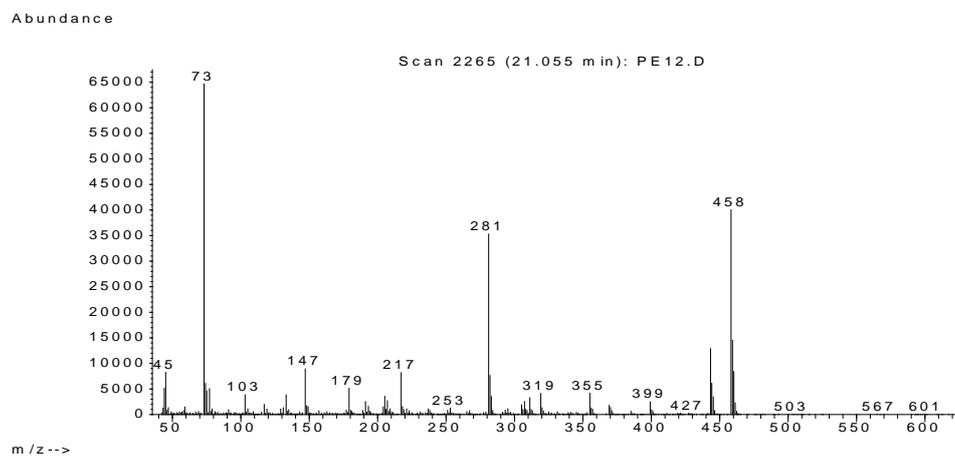
### Anexo 12. Espectro de masas de la lactona -2, 3, 5, 6-tetrahidroxigalactónico



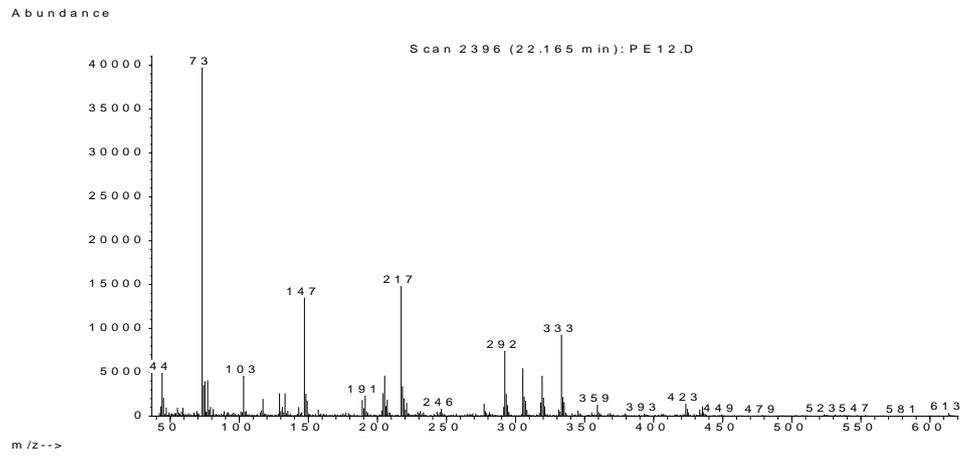
### Anexo 13. Espectro de masas de la D-galactosa



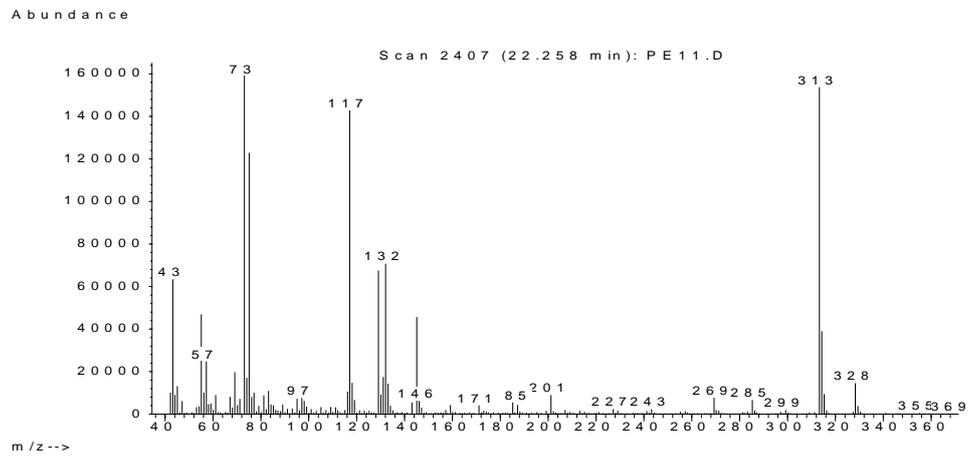
### Anexo 14. Espectro de masas del ácido gálico



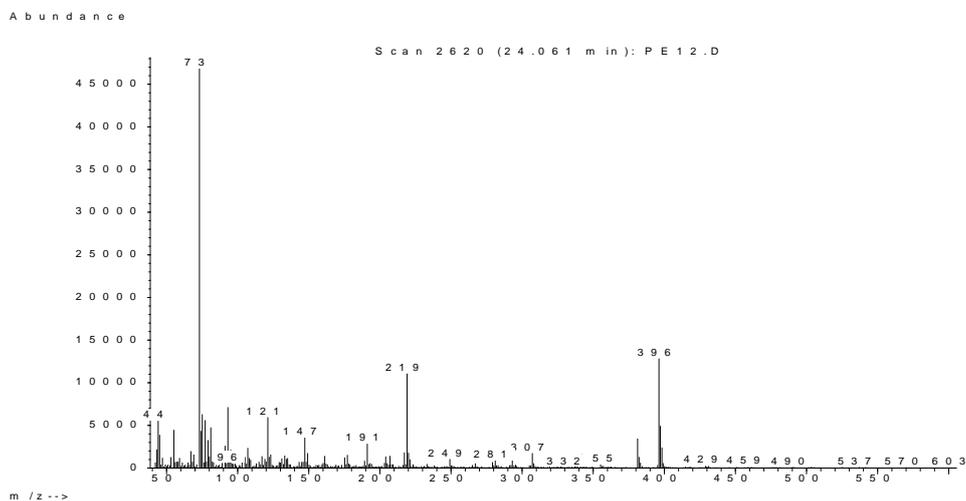
### Anexo 15. Espectro de masas del ácido glucónico



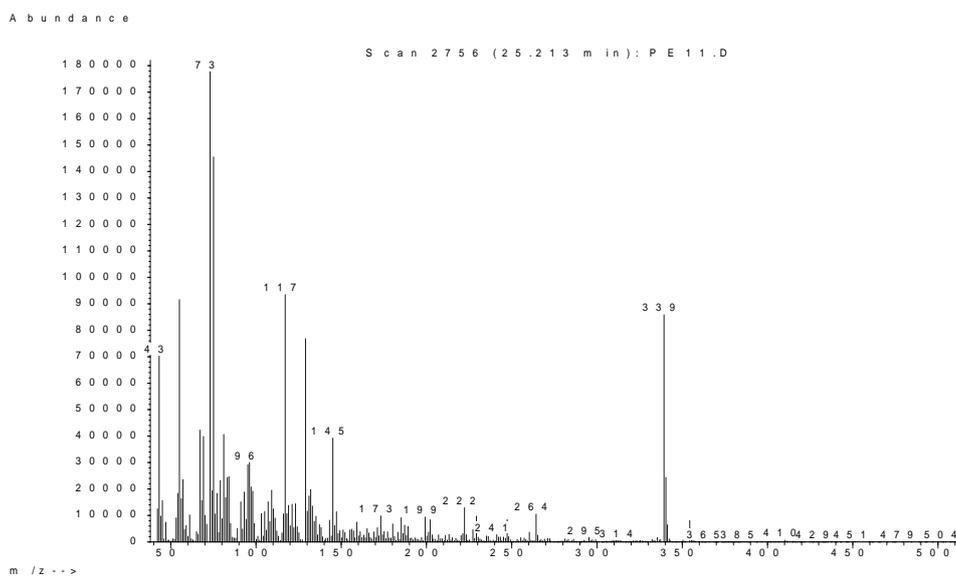
### Anexo 16. Espectro de masas del ácido hexadecanoico



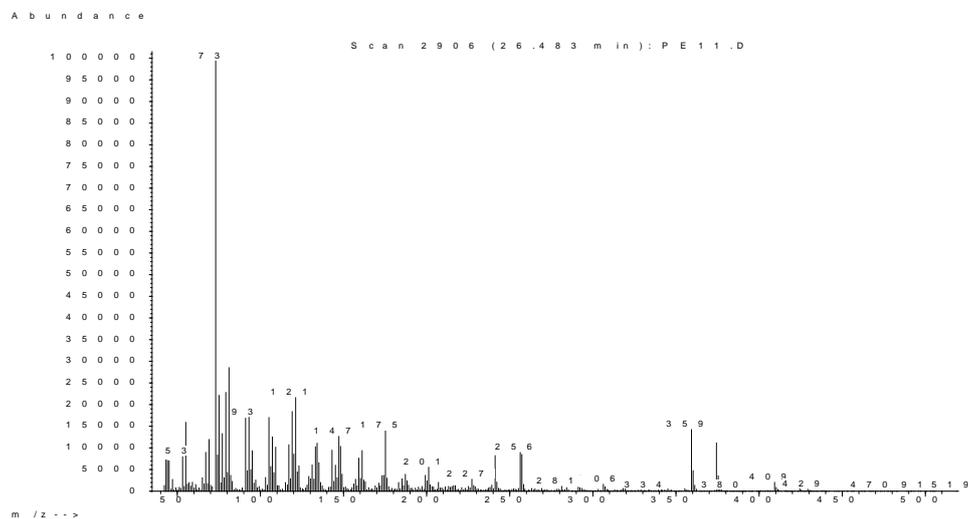
### Anexo 17. Espectro de masas del ácido cafeico



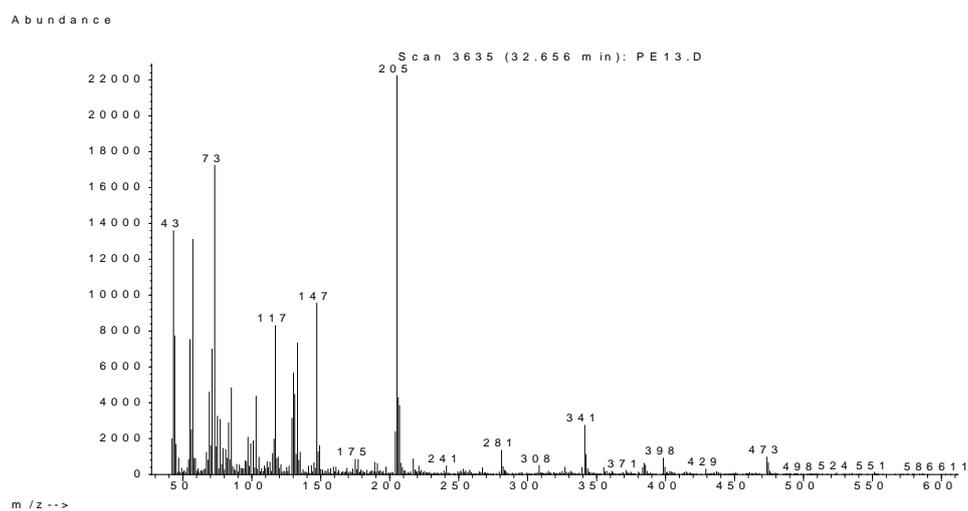
### Anexo 18. Espectro de masas del ácido oleico (ácido 9-octadecenoico)



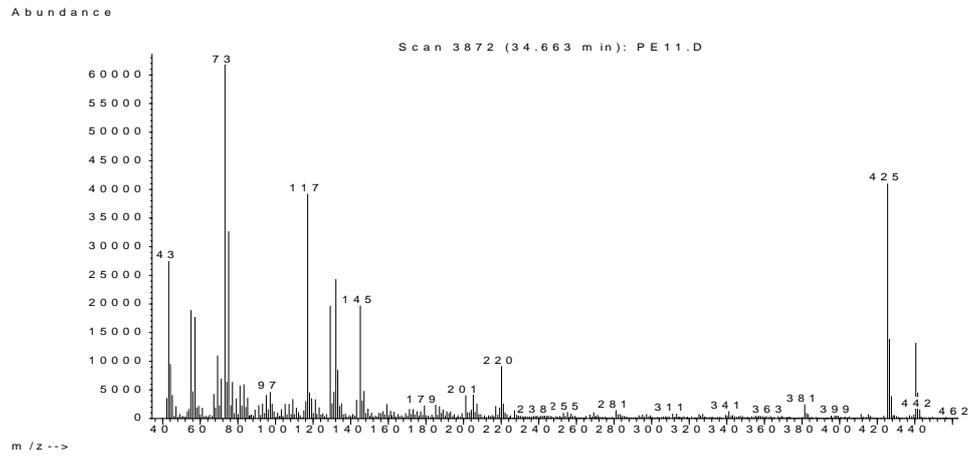
### Anexo 19. Espectro de masas del ácido pimárico



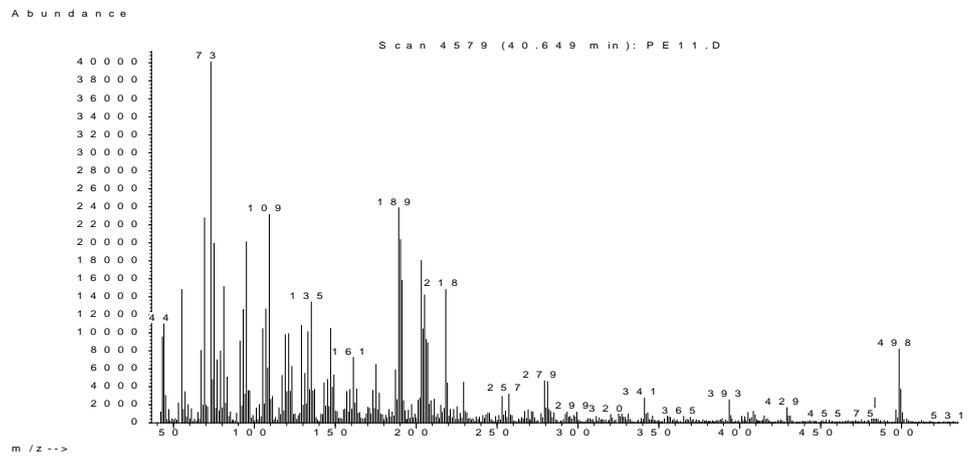
### Anexo 20. Espectro de masas del octadecilglicerol



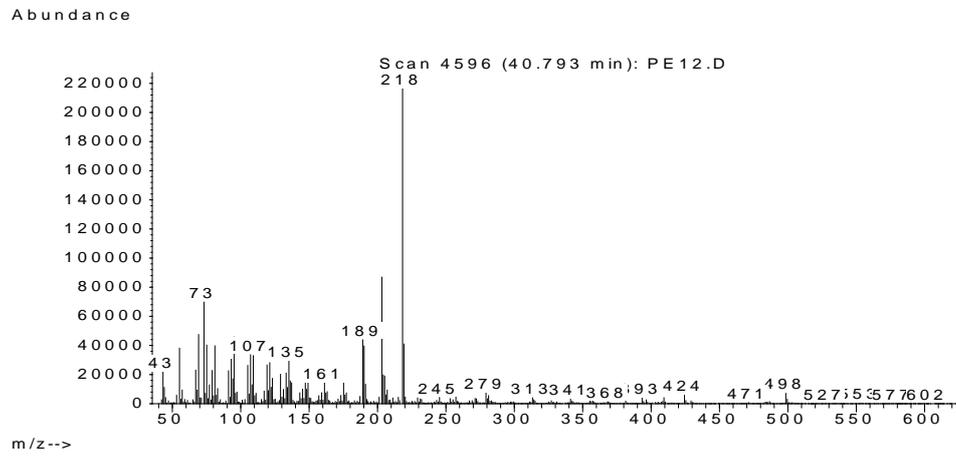
### Anexo 21. Espectro de masas del ácido tetracosanoico



### Anexo 22. Espectro de masas del triterpeno



Anexo 23. Espectro de masas del  $\beta$ -amirina



## Glosario

### C

Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de masas (CG-EM): Es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad (Gutiérrez Gaitén, Miranda Martínez, Bello Alarcón, Verona Hernández, & de Oca Porto, 2011).

Cromatografía en capa delgada (CCD): Técnica que localiza dentro de la mezcla aquellas sustancias con actividad biológica en un extracto orgánico que se ha separado en sus componentes por cromatografía de placa, además de determinar el grado de pureza de un compuesto (Lorenzo, Frías, Villa, & del Valle, 2006).

Concentración mínima inhibitoria (CMI): Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación (Ramírez & Castano, 2009).

### E

Éteres de glicerina: Está constituida al menos en un 90 % por un monoalquileter o un dialquileter de glicerina con doce a veintidós átomos de carbono, siendo estables frente a reacciones de degradación hidrolíticas o catalíticas mediante sales ácidas antitranspirantes (sales de aluminio y circonio) (Lopez Pedrajas, 2017).

## **P**

Propóleos: Es un material duro y resinoso derivado de las abejas de jugos de plantas y utilizados para sellar aberturas en las colmenas (Balata, El Nahas, & Radwan, 2014).

Polioles: Son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo, obtenidos a partir de azúcares simples mediante un proceso de hidrólisis enzimática; además son utilizados como sustitutos del azúcar, debido a su sabor dulce y a su bajo poder calórico (Marquez Hernandez et al., 2010).

## **T**

Triterpenos: Son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo cincoátomos de carbono, llamado *isopreno* (Robles et al., 2005).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alday, E., Navarro-Navarro, M., Garibay-Escobar, A., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2016). Advances in Pharmacological Activities and Chemical Composition of Propolis Produced in Americas. In *Beekeeping and Bee Conservation-Advances in Research*. InTech.
- Al-Ghamdi, A. A., Bayaqoob, N. I. M., Rushdi, A. I., Alattal, Y., Simoneit, B. R. T., El-Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2016). Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Al-Hariri, M. T. (2011). Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect. *Journal of Family and Community Medicine*, 18(3), 152.
- Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2015). Identification of unwanted photoproducts of cosmetic preservatives in personal care products under ultraviolet-light using solid-phase microextraction and micro-matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 1390, 1–12.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12), 1732–1740.
- Audier, H. E., Beugelmans, R., & Das, B. C. (1966). Mass spectrometry of tetracyclic triterpenes part II. The lanostane group: Influence of the 9: 19-cyclopropane ring. *Tetrahedron Letters*, 7(36), 4341–4347.
- Ayres, D. C., Marcucci, M. C., & Giorgio, S. (2007). Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2), 215–220.
- Balata, G., El Nahas, H. M., & Radwan, S. (2014). Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. *Drug Delivery*, 21(1), 55–61.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., ... others. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 1–49.
- Bankova, V., Marcucci, M. C., Simova, S., Nikolova, N., Kujumgiev, A., &

- Popov, S. (1996). Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 51(5-6), 277–280.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.-G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 57(5-6), 530–533.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 28.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). New emerging fields of application of propolis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1–11.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Bellón Leyva, S., & Calzadilla Mesa, X. M. (2007). Efectividad del uso del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Revista Cubana de Estomatología*, 44(3), 0.
- Benveniste, J., Mangold, B. B. V. H. K., & Paltauf, F. (1983). Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects. *HK Manhold, Paltauf (Eds.) Academic Press, Amsterdam*, 335–341.
- Bezerra, A. M. F., Bezerra, K. K. S., Fernandes Filho, A., Casimiro, G. S., Pereira, R. S. M., Nunes, E. M., ... others. (2015). Action of Propolis on Microorganisms of the Oral Cavity: an Integrative Review. *International Archives of Medicine*, 8.
- Bhatia, A., Maisonneuve, J.-F., & Persing, D. H. (2004). Propionibacterium acnes and chronic diseases. In *The Infectious Etiology of Chronic Diseases: Defining the Relationship, Enhancing the Research, and Mitigating the Effects: Workshop Summary.*, Knobler, SL et al.(eds.) (pp. 74–80).
- Boisard, S., Le Ray, A.-M., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C., & Richomme, P. (2015). Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- BORIE, C., Monreal, Z., Guerrero, P., Sanchez, M. L., MARTINEZ, J., ARELLANO, C., & PRADO, V. (1997). Prevalencia y caracterización

- de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29(2), 205–212.
- Brüggemann, H., Henne, A., Hoster, F., Liesegang, H., Wiezer, A., Strittmatter, A., ... Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, 305(5684), 671–673.
- Budzikiewicz, H., Wilson, J., & Djerassi, C. (1963). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. 1 Pentacyclic triterpenes. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3688–3699.
- Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2017). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Natural Product Research*, 31(11), 1318–1324.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.
- Campo, F. M. (2007). Estudio químico de propóleos rojos cubanos. *Trabajo de Graduación Para Instituto de Farmacia Y Alimentos, Para Optar Al Grado de Doctor En Ciencias Farmacéuticas, Universidad de La Habana, Habana, Cuba*.
- Capoci, I. R. G., Bonfim-Mendonça, P. de S., Arita, G. S., Pereira, R. R. de A., Consolaro, M. E. L., Bruschi, M. L., ... Svidzinski, T. I. E. (2015). Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Cardinault, N., Cayeux, M.-O., & du Sert, P. P. (2012). La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*, 10(5), 298–304.
- Casarin, M., Corvaja, C., Di Nicola, C., Falcomer, D., Franco, L., Monari, M., ... Piccinelli, F. (2005). One-dimensional and two-dimensional coordination polymers from self-assembling of trinuclear triangular Cu (II) secondary building units. *Inorganic Chemistry*, 44(18), 6265–6276.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista*

- Latinoamericana de Patología Clínica Y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40.
- Chang, T.-L., Mead, T. E., & Zinkel, D. F. (1971). Mass spectra of diterpene resin acid methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(9), 455–461.
- Chatterjee, M., Anju, C. P., Biswas, L., Kumar, V. A., Mohan, C. G., & Biswas, R. (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(1), 48–58.
- Chen, C.-T. A. (2005). Tracing tropical and intermediate waters from the South China Sea to the Okinawa Trough and beyond. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 110(C5).
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 20(06), 531–536.
- Chung, P. Y., Navaratnam, P., & Chung, L. Y. (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10(1), 25.
- Cuesta-Rubio, O., Fernández, M. C., Hernández, I. M., Jaramillo, C. G. J., González, V. H., Porto, R. M. D. O., ... others. (2017). Chemical profile and anti-leishmanial activity of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. *Fitoterapia*, 120, 177–183.
- da Costa, M. F. B., Libório, A. B., Teles, F., da Silva Martins, C., Soares, P. M. G., Meneses, G. C., ... others. (2015). Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine*, 22(9), 787–795.
- Da Silva, E. L., & Menezes, E. M. (2005). Metodologia da pesquisa e elaboracao de dissertacao. *UFSC, Florianopolis, 4a. Edicao*, 123.
- da Silva, J. B. N. F., de Oliveira, S. K. M., Campos, I. A., de Carvalho-Júnior, C. H. R., da Cunha Coutinho, T., & Silva, T. G. (2013). Propionibacterium acnes-killed attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis by modulating inflammatory factors. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(1), 20–26.

- das Neves, M. V. M., da Silva, T. M. S., de Oliveira Lima, E., da Cunha, E. V. L., & de Jesus Oliveira, E. (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(1), 159–166.
- de Groot, A. C. (2013). Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, *24*(6), 263–282.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Diaz, J. C. (2001). Apiterapia hoy en Argentina y Cuba. *Estaci{ó}n Experimental Apícola. Cuba*, 1–127.
- Duke, C. C., Tran, V. H., Duke, R. K., Abu-Mellal, A., Plunkett, G. T., King, D. I., ... Bruhl, J. J. (2017). A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated p-coumarate ester and stilbenes. *Phytochemistry*, *134*, 87–97.
- Enzell, C. R., & Wahlberg, I. (1969). Mass spectrometric studies of diterpenes. *Acta Chem Scand*, *23*, 871–890.
- Enzell, C. R., Wahlberg, I., & Gunnarsson, L.-E. (1974). Mass spectrometric studies of diterpenes: VIII Epimers. *Journal of Mass Spectrometry*, *9*(4), 372–394.
- Eurofarma. (2016). Laboratorio de control microbiológico y fisicoquímico de cosméticos y productos de higiene. Retrieved from <http://www.eurofarma.es/laboratorio.cosmeticos.html>.
- European Commission. (2018). *Preservatives*. Retrieved from [https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/preservatives\\_en](https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/preservatives_en)
- Fernandes-Ferreira, M., Novais, J. M., Salome, M., & Pais, S. (1990). Free triterpenols and sterols produced by in vitro cultures and laticifer cells from *Euphorbia characias*. *Phytochemistry*, *29*(6), 1855–1860.
- Feuillolay, C., Pecastaings, S., Le Gac, C., Fiorini-Puybaret, C., Luc, J., Joulia, P., & Roques, C. (2016). A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. *Phytomedicine*, *23*(3), 307–315.

- Goik, U., Ptaszek, A., & Goik, T. (2015). The influence of propolis on rheological properties of lipstick. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(4), 417–424.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V., & Chinou, I. (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT-Food Science and Technology*, 65, 261–267.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1987). The Analysis of Bud Exudate of *Populus euramericana*, and of Propolis, by Gas Chromatography--Mass Spectrometry. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 232(1268), 249–272.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, 71(3), 107–118.
- Gutiérrez Gaitén, Y. I., Miranda Martínez, M., Bello Alarcón, A., Verona Hernández, S., & de Oca Porto, R. (2011). Caracterización química por cromatografía de gases/espectrometría de masas de dos extractos obtenidos de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(3), 405–413.
- Handa, S., & others. (2012). Propionibacterium infections. *Didapat Dari: Wwww. Emedicine. Com*.
- Heinzen, H., de Vries, J. X., Moyna, P., Remberg, G., Martinez, R., & Tietze, L. F. (1996). Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. *Phytochemical Analysis*, 7(5), 237–244.
- Hernández-Vázquez, L., Palazon, J., & Navarro-Ocaña, A. (2012). The pentacyclic triterpenes,-amyrins: a review of sources and biological activities. *Phytochemicals A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. chapter.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610–19632.
- Jean-Prost, P. (2007). *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la*

*colmena*. Mundi-Prensa Libros.

- Jeong, C. H., Bae, Y. I., Lee, H. J., & Shim, K. H. (2003). Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, *116*(2), 452–461.
- Karliner, J., & Djerassi, C. (1966). Terpenoids. LVII. 1 Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbons<sup>2</sup>. *The Journal of Organic Chemistry*, *31*(6), 1945–1956.
- Kasote, D., Suleman, T., Chen, W., Sandasi, M., Viljoen, A., & van Vuuren, S. (2014). Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. *Biochemical Systematics and Ecology*, *55*, 156–163.
- Katerere, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., & Waigh, R. D. (2003). Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*, *63*(1), 81–88.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Food & Agriculture Org.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K., ... Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 156.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, *84*(3), 329–339.
- La Cerda, Libia; Veras, Mariana; Melo, L. (2014). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*.
- Lecce, R., Regazzoni, L., Mustazza, C., Incarnato, G., Porrà, R., & Panusa, A. (2016). Screening of preservatives by HPLC-PDA-ESI/MS: A focus on both allowed and recently forbidden compounds in the new EU cosmetics regulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *125*, 260–269.

- Lemmel, J. (2008). Conservantes: tipos y sistemas de conservaci{ó}n. *Offarm: Farmacia Y Sociedad*, 27(1), 58–64.
- Leranoz, S. (2002). Conservantes cosm{é}ticos. *Offarm: Farmacia Y Sociedad*, 21(7), 74–78.
- Li, F., Awale, S., Zhang, H., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2009). Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1283–1287.
- Lopez Pedrajas, S. (2017). Obtencion de compuestos quimicos de interes a partir de fuentes renovables:(oxi) deshidratacion de glicerina empleando nuevos sistemas cataliticos.
- López, A. S., Marti, A., Subovsky, M., & Castillo, A. (2016). Métodos de recolección de Propóleos: su incidencia en rendimiento y calidad. *Agrotecnia*, (10), 10–14.
- Lorenzo, M., Fr'vias, A., Villa, P., & del Valle, M. (2006). Detecci{ó}n por cromatograf{'}i'a de capa fina (CCF) de metabolitos antinf{ú}ngicos producidos de Pseudomonas aeruginosa cepa PSS. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Ca{ña} de Az{ú}car*, 40(1), 27–30.
- Madureira, A. M., Ascenso, J. R., Valdeira, L., Duarte, A., Frade, J. P., Freitas, G., & Ferreira, M. J. U. (2003). Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from Euphorbia segetalis. *Natural Product Research*, 17(5), 375–380.
- Mallavadhani, U. V., Mahapatra, A., Jamil, K., & Reddy, P. S. (2004). Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(10), 1576–1579.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26(2), 83–99.
- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., & Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry*, 42(1), 205–211.
- Marquez Hernandez, I., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rosado Perez, A., de Oca Porto, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2010). Studies on the

- constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4725–4730.
- MÁRQUEZ, D. M., Galeano, E., & Martínez, A. (2003). Productos naturales con actividad antimicrobiana parte I. *Vitae*, 10(2).
- Matny, O. N. (2015). Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathology Journal*, 14(3), 153.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70(06), 515–519.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Cruz, C., Duarte, J., Antunes, M. D., Cavaco, A. M., ... others. (2013). Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and-untreated beehives maintained at Algarve (Portugal). *Natural Product Research*, 27(8), 743–749.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2016). Ecuador tiene potencial para la apicultura. Retrieved from <http://www.agricultura.gob.ec/ecuador-tiene-potencial-para-la-apicultura/>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2017). Ecuador tiene potencial para la Apicultura. Retrieved from <http://www.agricultura.gob.ec/ecuador-tiene-potencial-para-la-apicultura/>
- Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Márquez Hernandez, I., Fraga, J., Pérez, K., ... Cos, P. (2012). In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 978–984.
- Muñoz Rodríguez, L. C., Linares Villalba, S. E., & Narváez Solarte, W. (2011). Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*, 10(2), 101–111.
- Navarro-Navarro, M., Lugo-Sepúlveda, R. E., del Carmen García-Moraga, M., de la Rosa-López, R., Robles-Zepeda, R. E., Ruiz-Bustos, E., & Velázquez-Contreras, C. A. (2012). Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora. *Biotecnia*, 14(3), 9–15.
- Nina, N., Lima, B., Feresin, G. E., Giménez, A., Salamanca Capusiri, E., &

- Schmeda-Hirschmann, G. (2016). Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Letters in Applied Microbiology*, 62(3), 290–296.
- Noia, M. A., Cardenas, F. C., Villat, M., Laporte, G., Sereno, D., Otrosky, R. N., & Mestorino, N. (2017). Características físico-químicas y microbiológicas de mieles de La Pampa. *Ciencia Veterinaria*, 11(1).
- Noriega, V. (2014). El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. *Cantabria: Universidad de Cantabria. Obtenido de [Http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV. P Df](http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.PDf)*.
- Oliveira, L. de L. de, Carvalho, M. V. de, & Melo, L. (2014). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres*, 61, 764–779.
- Oliveira, A. V., Ferreira, A. L., Nunes, S., Dandlen, S. A., Miguel, M. da G., & Faleiro, M. L. (2017). Antibacterial activity of propolis extracts from the south of Portugal. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1).
- Ortiz-Herrera, M., Gerónimo-Gallegos, A., Cuevas-Schacht, F., Pérez-Fernández, L., & Coria-Jiménez, R. (2004). Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Pública de México*, 46(2), 149–157.
- Palomino, L. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. *Universidad Nacional de Colombia. Medellín*.
- Park, J. S., & Woo, K. S. (1996). The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. In *International Conference on Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy* (Vol. 75).
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502–2506.
- Paula, V. B., Estevinho, L. M., & Dias, L. G. (2017). Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. *Journal of Apicultural Research*, 56(5), 569–580.
- Peña, R. C. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia E Investigación Agraria*, 35(1), 17–

26.

- Pereira, Neila de Paula; Dourado, D. (2017). El perfil de la agricultura brasileña como fuente de materia prima para obtener cosméticos orgánicos. *J Pharm Pharmacogn Res*, 165–166.
- Pesantez, B. R. J., & Balcázar, C. M. I. L. (n.d.). APICULTURA EN EL ECUADOR.
- Pippi, B., Lana, A. J. D., Moraes, R. C., Güez, C. M., Machado, M., Oliveira, L. F. S., ... Fuentefria, A. M. (2015). In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 839–850.
- Plaza Juárez, C. M. (2017). Evaluación de la composición química y actividad antileishmanial de cuatro muestras de propóleos ecuatorianos de abejas sin aguijón.
- Plessi, M., Bertelli, D., & Miglietta, F. (2006). Extraction and identification by GC-MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 49–54.
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., & Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(10), 1262–1271.
- Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I., & Bankova, V. S. (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3167–3176.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126(3), 1431–1435.
- Popova, M., Trusheva, B., Cutajar, S., Antonova, D., Mifsud, D., Farrugia, C., & Bankova, V. (2012). Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis. *Natural Product Communications*, 7(5), 569–570.
- Porto, T. S., Rangel, R., Furtado, N. A. J. C., De Carvalho, T. C., Martins, C. H. G., Veneziani, R., ... others. (2009). Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules*, 14(1), 191–199.

- Proestos, C., & Komaitis, M. (2013). Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after silylation. *Foods*, 2(1), 90–99.
- Qian, W. L., Khan, Z., Watson, D. G., & Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1), 78–83.
- Ramirez, L. S., & Castano, D. M. (2009). Metodologias para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2(42).
- Rebiai, A., Belfar, M. L., Mesbahi, M. A., Nani, S., Tliba, A., Amara, D. G., & Chouikh, A. (2017). Fatty Acid Composition of Algerian Propolis. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(3), 1656–1671.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., & Tyler, V. E. (1996). *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Williams & Wilkins.
- Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A. I., Pineros, C., Ortiz, L., & Sierra, M. (2005). Triterpenos aislados de corteza de *Bursera graveolens* (Burseraceae) y su actividad biológica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), 283–286.
- Sahinler, N., & Kaftanoglu, O. (2005). Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*, 19(2), 183–188.
- Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G., & others. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33–38.
- Samara Ortega, N., Benítez Campo, n., & Cabezas Fajardo, F. A. (2011). Actividad antibacteriana y composicion cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Antibacterial Activity and Cualitative Composition Propolis from Two Climatic Regions Cauca Department*.
- Sati, A., Sati, S. C., Sati, N., & Sati, O. P. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of fatty acid methyl ester of *Quercus leucotrichophora* fruits. *Natural Product Research*, 31(6), 713–717.
- Seydi, E., Hosseini, S. A., Salimi, A., & Pourahmad, J. (2016). Propolis induce cytotoxicity on cancerous hepatocytes isolated from rat model of

- hepatocellular carcinoma: Involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting. *PharmaNutrition*, 4(4), 143–150.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*, 30(6), 894–905.
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253–260.
- Sforcin, J. M., Orsi, R. O., & Bankova, V. (2005). Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 301–305.
- Shahdordizadeh, M., Taghdisi, S. M., Ansari, N., Langroodi, F. A., Abnous, K., & Ramezani, M. (2017). Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 619–635.
- Shrestha, S. P., Narukawa, Y., & Takeda, T. (2007). Chemical constituents of Nepalese propolis (II). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(6), 926–929.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69–73.
- Singh, R. P., & Jain, D. A. (2011). Evaluation of Antimicrobial activity of volatile oil and total curcuminoids extracted from turmeric. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 1172–1178.
- Soltani, E.-K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., & Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 57–67.
- Stafilov, T., & Kulevanova, S. (1994). Determination of some trace elements in propolis by atomic absorption spectrometry. *Anal. Lab*, 3(4), 207–214.
- Talero, C., Hernández, D., & Figueroa, J. (2012). Calidad microbiológica de propolis crudo y sólidos solubles de extractos de propolis de *Apis mellifera* en Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia*, 59(2), 109.

- Talla, E., Tamfu, A. N., Gade, I. S., Yanda, L., Mbafor, J. T., Laurent, S., ... Bankova, V. (2017). New mono-ether of glycerol and triterpenes with DPPH radical scavenging activity from Cameroonian propolis. *Natural Product Research*, 31(12), 1379–1389.
- Tamfu, A. N., Domgnim, M. E. C., Talla, E., Tan, P. V., Mbafor, T. J., Milena, P., & Vassya, B. (2016). Chemical constituents and anti-ulcer activity of propolis from the North-West region of Cameroon. *Res J Phytochem*, 10, 45–57.
- Teixeira, E. W., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P. C., & others. (2010). Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 307–315.
- Vargas Sánchez, R. D., Torrescano Urrutia, G. R., & Sánchez Escalante, A. (2013). El prop{ó}leos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10).
- Vega Picón, M. A. (2015). *Evaluación de la eficacia del aceite esencial de Curcuma Longa como conservante en una formulación cosmética orgánica*. Quito.
- Velasquez, Boris; Montenegro, S. (2017). Antimicrobial activity of ethanol extracts of propolis obtained of bees *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria*.
- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift F{ü}r Naturforschung C*, 55(9-10), 785–789.
- Veloz, J. J., Saavedra, N., Lillo, A., Alvear, M., Barrientos, L., & Salazar, L. A. (2015). Antibiofilm activity of Chilean propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year of collection. *BioMed Research International*, 2015.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013.
- Wilson, M. B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G., & Cohen, J. D. (2015). Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis

- against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 44–50.
- Wolska, K., Grudniak, A., Fiecek, B., Kraczkiewicz-Dowjat, A., & Kurek, A. (2010). Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Open Life Sciences*, 5(5), 543–553.
- Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., ... Hu, F. (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Zhang, K., & Zuo, Y. (2004). GC-MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 222–227.
- Zhang, T., Omar, R., Siheri, W., Al Mutairi, S., Clements, C., Fearnley, J., ... Watson, D. (2014). Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta*, 120, 181–190.
- Zwolan, W., Meresta, T., & others. (2000). Bacteriostatic action of the volatile oils obtained from propolis extracts in relation to *Staphylococcus aureus*. *Herba Polonica*, 46(1), 30–34.

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

## UNIDAD DE POSGRADOS

---

### MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS COSMÉTICAS

**Autoras:**

Anita Lucia Guaraca Merchán

Diana Lucia Palomino Calderón

**Dirigida por:**

Mercedes Campo., Ph.D

---

## ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MUESTRAS DE PROPÓLEOS DE DIFERENTE LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

Los propóleos son una sustancia resinosa y aromática producida por las abejas, principalmente por la especie *Apis mellifera*, a partir de resinas de partes de vegetales.

El objetivo de la investigación fue establecer la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de diferentes extractos de propóleos que fueron colectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay y Loja, determinando su posible aplicación en la industria cosmética como un conservante natural o sustancia activa biológicamente.

La composición química de los propóleos es muy variable dependiendo de su localización geográfica. Con el empleo de la CG-EM, se pudieron identificar los principales compuestos químicos de las muestras estudiadas. Estos fueron: azúcares, polioles, ácidos fenólicos simples, ácidos grasos, estructuras terpénicas (diterpenos y triterpenos) así como otras no identificadas por la base de datos.

La actividad antibacteriana se determinó por el método de microdilución en placas frente a cepas de *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* siendo efectivo PE -11 frente a las cuatro cepas con CMI de 3,75 mg/mL. Respectivamente para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y 1,875 mg/mL para *P. acnes*. La muestra PE -12 presentó igual efectividad frente a las cuatro bacterias objeto de estudio, mientras que el PE-13 es más efectivo frente a *Escherichia coli*, aunque no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre los tres propóleos. La cuantificación relativa llevada a cabo mediante CG-EM mostró que no existe un metabolito secundario mayoritario en ninguna de las muestras, por lo que la actividad antibacteriana mostrada se asocia a la mezcla de los diversos metabolitos identificados, siendo más efectivas frente a las bacterias Gram positivas ensayadas.